

天然資源由来の自然免疫応答制御物質の探索

著者	藤村 信平
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/55105

平成 23 年度修士論文

天然資源由来の自然免疫応答制御物質の探索

東北大学大学院薬学研究科
分子薬科学専攻 医薬資源化学分野
学籍番号 B0YM1030 藤村 信平

本論文中において以下の略記を用いた.

Abs	: absorbance
Ac	: acetyl
br	: broad
BSA	: bovine serum albumin
Bu	: butyl
calcd	: calculated
COSY	: correlated spectroscopy
DAP	: diaminopimelic acid
DMSO	: dimethylsulfoxide
Dpt	: dipteridin
EGM	: endothelial growth medium
EIMS	: electron impact mass spectrum
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
Et	: ethyl
FABMS	: fast atom bombardment mass spectroscopy
FBS	: fetal bovine serum
Fr.	: fraction
gal	: galactosidase
GPC	: gel permeation chromatography
HMBC	: heteronuclear multiple bond connectivity
HMQC	: heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	: high performance liquid chromatography
HR	: high resolution
HS	: heat shock
HUVEC	: normal human umbilical vein endothelial cell
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration

IL	: interleukin
LPS	: lipopolysaccharide
LR	: low resolution
Me	: methyl
NMR	: nuclear magnetic resonance
OD	: optical density
ODS	: octadecyl silica gel
PGN	: peptidoglycan
TLC	: thin layer chromatography
TLR	: Toll-like receptor
TNF	: tumor necrosis factor
UV	: ultraviolet
WL	: wave length

天然資源由来の自然免疫応答制御物質の探索

序論	1
本論	
第1章 糸状菌 <i>Aspergillus</i> sp. に含まれる自然免疫応答抑制物質の探索	
第1節 <i>Aspergillus</i> sp. に含まれる自然免疫応答抑制物質 10 の単離	10
第2節 化合物 10 の構造解析	13
第3節 新規デプシペプチド 10 および aspergillicin E (14) の活性評価	24
第4節 考察	26
第2章 放線菌 <i>Streptomyces hygroscopicus</i> に含まれる自然免疫応答抑制物質の探索	
第1節 <i>Streptomyces hygroscopicus</i> に含まれる自然免疫応答抑制物質 12 の単離	28
第2節 化合物 12 の構造解析	33
第3節 新規 trichostatin 誘導体 12 および trichostatin A (13) の活性評価	35
第4節 考察	38
第3章 放線菌 <i>Streptomyces</i> sp. に含まれる転写・翻訳抑制物質の探索	
第1節 <i>Streptomyces</i> sp. に含まれる転写阻害物質 13 の単離	40
第2節 化合物 13 の構造解析	43
第3節 新規オーレオリン酸類縁化合物 13 の活性評価	52
第4節 考察	53
結語	55
実験の部	56
参考文献	72
謝辞	75

序論

地球上の生物種は自らの生命を守り種の存続をはかるため、長い進化の過程で様々な体の仕組みを獲得してきた。外界からの異物侵入を防ぐ生体防御機構はその最たるものであり、病原微生物に対する免疫応答は生体防御機構の中心的な役割を果たしている。

ヒトを含む脊椎動物の免疫は、獲得免疫と自然免疫という二つの免疫機構で成立している。獲得免疫とはT細胞、B細胞の遺伝子再編成により、侵入した異物を記憶し、抗原－抗体反応を主として特異的に異物を認識して排除するという高度に洗練された機構である。そのため、獲得免疫には、一度感染した病原微生物に対しては、その異物に対する記憶ができるため、再び感染した際には速やかな免疫応答が起こるという利点がある。¹ 一方、初めて侵入した異物に対しては、免疫応答が活性化され、異物に対する抗体が産生されるまでには一週間程度かかるという欠点がある。

これに対し、自然免疫とは広範囲の微生物群の表面に共通するパターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を認識することにより、速やかに応答する一次防御反応としてはたらく免疫機構であり、大部分の異物は侵入後、数時間のうちに生体から排除される。² また、自然免疫は脊椎動物に限らず昆虫、植物など全ての多細胞生物が有しており、その活性化機構も高度に保存されているため、生物種を越えた普遍的な生体防御機構と考えられている。自然免疫に関する研究は近年精力的に行われており、獲得免疫の活性化にも自然免疫の活性化が必須であるということが明らかになっている。³ そのため、加齢などにより自然免疫が低下すると異物に対する抵抗力が低下し、健康な状態では感染症を引き起こさない病原体 (弱毒微生物、非病原性微生物) にまでも感染する日和見感染が起こりやすくなる。しかし、日和見感染症に対する対策は衛生面の改善による予防と感染後の抗生物質の投与などに限られ、抜本的な治療法は確立されていない。

一方、自然免疫の異常な活性化が起こった場合、敗血症を引き起こす。敗血症とは、体内に侵入した異物を局所的な免疫応答では排除しきれなくなり、全身で炎症性サイトカインが産生されることにより起きる疾患である。その結果、多臓器不全やエンドトキシン

ショックによって、死に至るなど重篤な症状を引き起こす。敗血症の治療法も現在のところ確立されておらず、輸液、カテコールアミン、バソプレシン、プロテインCの投与により、血圧及び血液凝固能の維持を目的とする対症療法が中心である。

自然免疫の破綻によって引き起こされるこれらの疾病に対して、自然免疫を特異的に制御する化合物は自然免疫を正常な状態に戻すことで効率的な治療を行うことが出来ると考えられる。自然免疫を活性化する化合物は、高齢者や免疫抑制剤の使用者の日和見感染を防ぐ治療薬になる。逆に自然免疫を抑制する化合物は、cyclosporin A (1) や FK506 (2) (Figure 1) のような獲得免疫を標的とする既存の医薬品では抑えられない、過剰に亢進した自然免疫応答を抑える敗血症の治療薬になると考えられる。敗血症の治療薬に関しては治験の段階にある化合物として eritoran (3)⁴ が知られているが、現在までに上市されている治療薬はない。(Figure 2)。したがって、自然免疫を制御する化合物を探索することは新規医薬品の開発に有用であると考えられる。

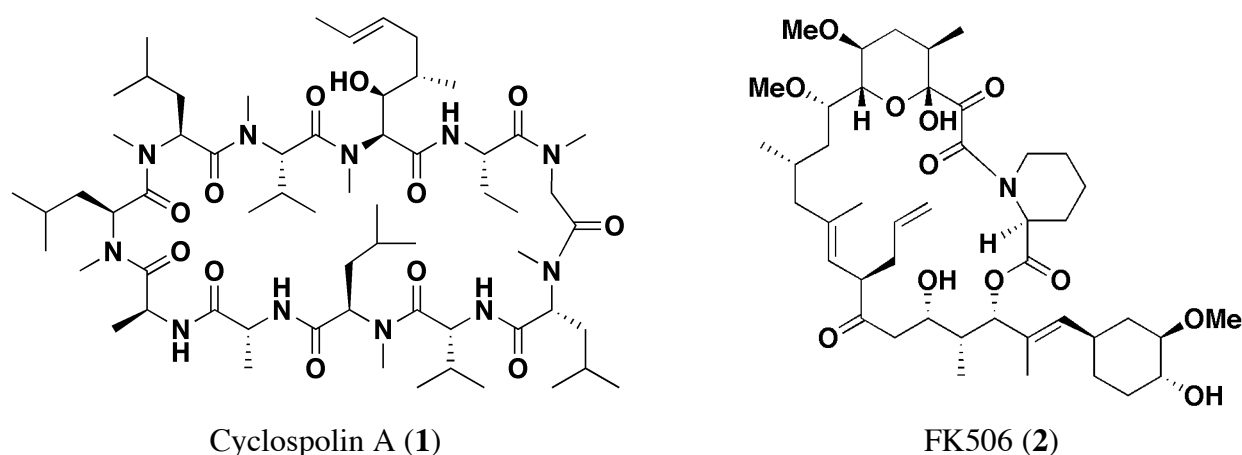


Figure 1. 現在臨床で用いられている免疫抑制剤

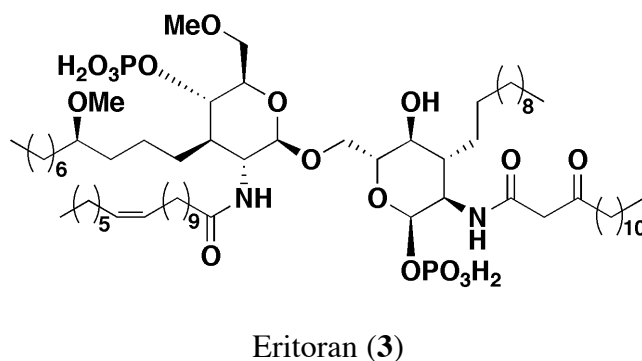


Figure 2. 現在臨床段階にある自然免疫応答抑制物質

当研究室では、自然免疫制御物質の探索において昆虫と哺乳類の自然免疫活性化機構の相同性が極めて高いことに着目した。⁵ ショウジョウバエの自然免疫活性化経路は imd 経路と Toll 経路に大別され、それぞれヒトの自然免疫活性化経路である TNF 経路, TLR 経路に相当する (Figure 3).⁶ 本研究でのスクリーニングでは、このうち imd 経路を標的としている。imd 経路と TNF 経路は、リガンドがレセプターに結合した後に、アダプター分子, MAP3 キナーゼ, IKK 複合体を介して, Rel タンパク質へとシグナルが伝わり, 活性化 Rel タンパク質によって, imd 経路では抗菌ペプチド, TNF 経路ではサイトカインの産生が誘導される。^{7,8} これらの自然免疫活性化に関与する因子はヒトとショウジョウバエの間で非常に類似しているため, ショウジョウバエを用いて自然免疫制御物質の探索を行うことは, ヒトの自然免疫を制御する物質の探索につながると考えられる。

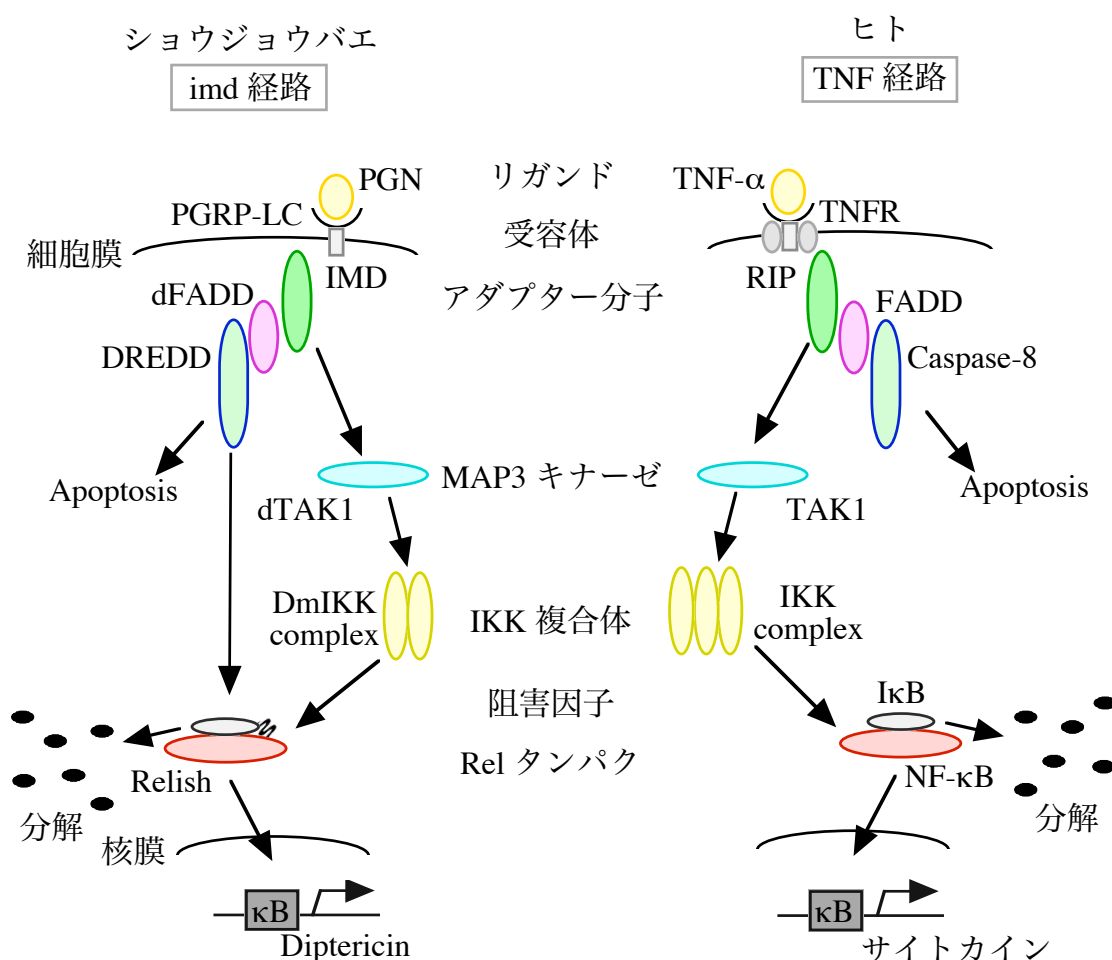


Figure 3. ショウジョウバエ imd 経路とヒト TNF 経路の自然免疫活性化機構

当研究室では、これまでにショウジョウバエを用いた自然免疫応答作用に対するアッセイ系を開発し、自然免疫制御物質の探索を行ってきた。^{9,10,11} この評価法ではショウジョウバエの抗菌ペプチドの1つである diptericin¹² の転写制御領域に、レポーター遺伝子 *lacZ* をつないだ外来遺伝子を導入した遺伝子導入ショウジョウバエを用いる (*Dpt-lacZ* 系)。この遺伝子導入ショウジョウバエにグラム陰性菌の細胞壁構成成分である DAP 型ペプチドグリカン (PGN) によって刺激を与えると imd 経路が活性化され、抗菌ペプチド *diptericin* 遺伝子の転写が促進されると共に、レポータータンパク質である β -galactosidase が産生される。そして、添加した試料が自然免疫応答に何らかの影響を与える場合、 β -galactosidase の産生量が増加する (Figure 4)。この原理に基づいて、PGN のみを添加した際の β -galactosidase 産生量に対して、試料を添加した際の β -galactosidase 産生量の増加、減少を検出することで、試料の自然免疫応答への作用を評価できる。

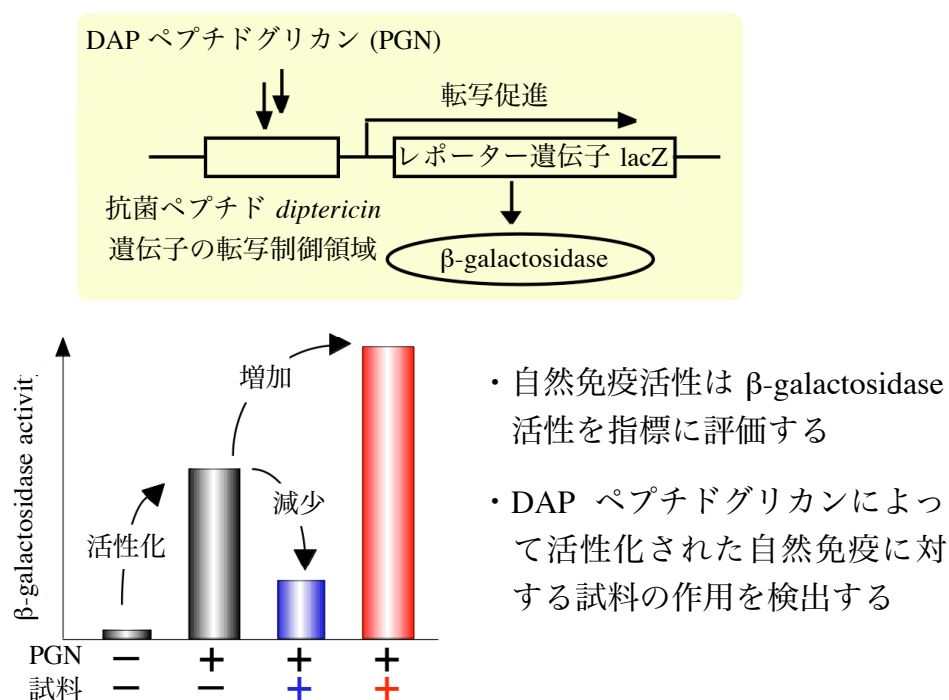
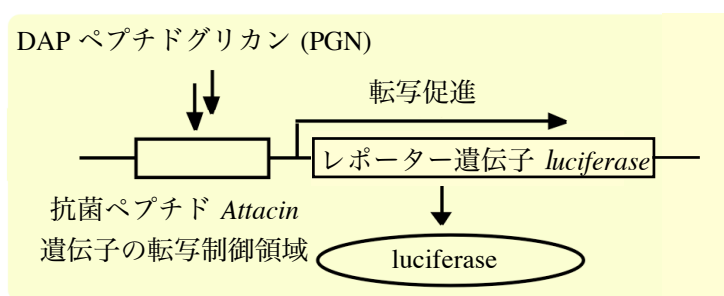


Figure 4. *Dpt-lacZ* 系による自然免疫応答の活性評価

自然免疫に対する作用検出には *Dpt-lacZ* 系の他に、培養細胞を用いたアッセイ系も組み合わせた (*Att-luc* 系). *Att-luc* 系では、ショウジョウバエの抗菌ペプチドの 1 つである attacin の転写制御領域に、レポーター遺伝子 *luciferase* をつないだプラスミドを導入した S2 細胞を用いた. attacin は diptericin と同様に imd 経路によって発現するため, *Dpt-lacZ* 系と同じように自然免疫応答への作用を評価することができる. *Dpt-lacZ* 系ではショウジョウバエの個体を用いるため、生体に近い環境で評価できることが特長であるが、操作が複雑であることが欠点である. 一方, *Att-luc* 系では活性評価を簡便に行う事が可能で、一度に大量のサンプルを同時にアッセイできることが利点であるが、培養細胞を用いるため、体内動態が生体と異なることが欠点である.



- ・自然免疫活性は *luciferase* 活性を指標に評価する
- ・DAP ペプチドグリカンによって活性化された自然免疫に対する試料の作用を検出する

Figure 5. *Att-luc* 系による自然免疫応答の活性評価

しかし、上述のアッセイ系 (*Dpt-lacZ* 系, *Att-luc* 系) だけでは自然免疫応答作用以外にも細胞毒性や転写・翻訳阻害作用も検出されるため、毒性物質や非特異的転写・翻訳阻害作用を有する化合物を排除するアッセイ系として、S2 細胞系, *hs-lacZ* 系を確立した.⁹

S2 細胞系とは、ショウジョウバエ由来の培養細胞である S2 細胞を用い、添加試料の細胞毒性を MTT 法により評価する系である. 細胞生存率が低下した場合に毒性物質とした (Figure 6).

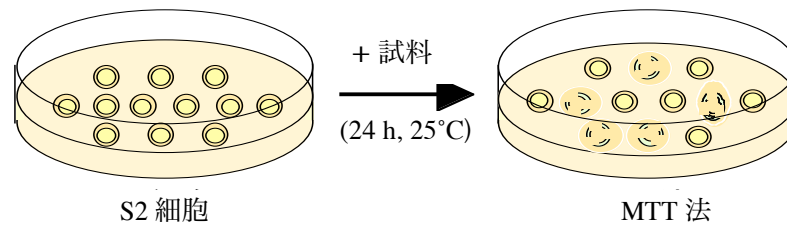


Figure 6. S2 細胞系による細胞毒性の評価

hs-lacZ 系とは、当研究室において開発された *hs-GAL4/UAS-lacZ* 系のショウジョウバエを用いた自然免疫非特異的転写・翻訳阻害作用の評価系である。この評価系では熱刺激によって、*heat shock promoter* 下流の酵母由来転写因子 GAL4 タンパク質の発現が誘導される。この GAL4 が、その認識配列である UAS (upstream activating sequence) に結合すると、UAS 下流のレポーター遺伝子 *lacZ* の転写が促進され、 β -galactosidase が産生される。したがって *hs-lacZ* 系では、熱刺激によって産生されるレポータータンパク質である β -galactosidase 産生量の減少を検出することによって、自然免疫非特異的な転写・翻訳の阻害作用を有する化合物の検出が可能である (Figure 7)。

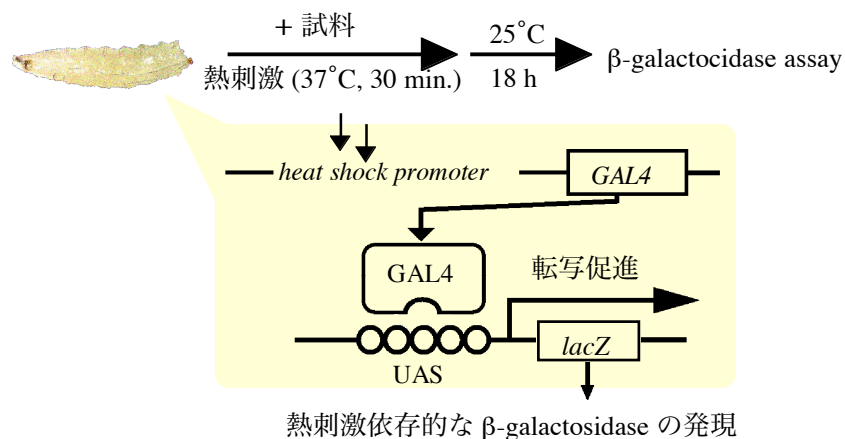


Figure 7. *hs-lacZ* assay による自然免疫非特異的活性評価系

したがって、S2 細胞系で毒性を示さず、*hs-lacZ* 系において β -galactosidase の産生を抑制せず、*Dpt-lacZ* 系において β -galactosidase の産生を抑制する化合物は自然免疫に対して選択的な抑制作用を有すると考えられる (Figure 8)。

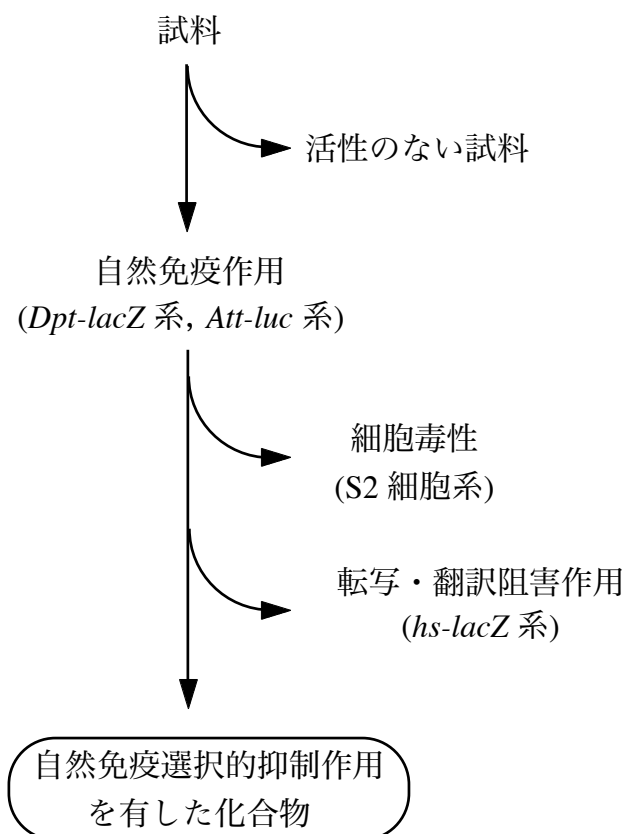


Figure 8. 自然免疫応答抑制作用物質のスクリーニング

これまでに当研究室では、前述のアッセイ系により放線菌・糸状菌及び植物などの天然資源を対象にスクリーニングを行ってきた。その結果、TP-1 (4)¹³ のような単純な構造の化合物から、celastramycin A (5)¹⁴ などの多官能性化合物、chartreusin (6)¹⁵ といった複雑な構造の化合物にいたるまで、多彩な構造の化合物を自然免疫応答制御物質として同定してきた。また、自然免疫応答を抑制する化合物のみならず、gonytolide A (7)¹⁶ のように自然免疫を増強する化合物も得られている。このように、本スクリーニングは多様な系統の化合物を検出することが可能であり、自然免疫応答制御物質の探索に有用である (Figure 9).

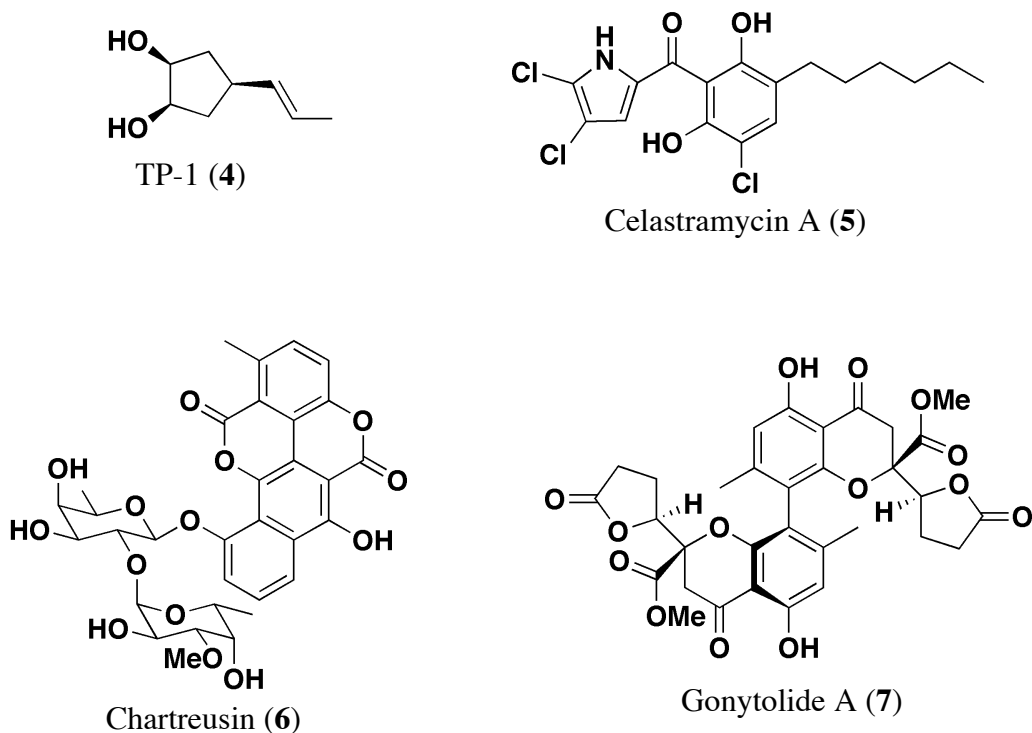


Figure 9. 本スクリーニングにより自然免疫応答制御物質として同定された化合物

本研究では、さらに有望な自然免疫制御物質を求めて、前述のアッセイ系により微生物抽出物を中心としたスクリーニングを引き続き行った。その結果、新たに2種の自然免疫応答抑制作用を示す抽出物を得た。得られた抽出物について自然免疫応答抑制作用を指標に分画を行った結果、糸状菌 *Aspergillus* sp. より新規環状デプシペプチド **8** を自然免疫応答抑制物質として単離した。また、放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* より、新規 trichostatin 誘導体 **9** を自然免疫応答抑制物質として単離した (Figure 10)。第1章および第2章ではこれらの化合物の単離、構造決定、及び自然免疫応答作用の活性評価について述べる。

また、スクリーニングの過程で *Dpt-lacZ* 系および *hs-lacZ* 系でほぼ同程度の抑制作用を示す抽出物を得た。このことからこの抽出物は自然免疫選択的ではなく転写・翻訳阻害作用を有すると判断し、分画を行った結果、転写阻害作用を有する新規オーレオリン酸類化合物 **10** を単離した (Figure 11)。第3章では本化合物の単離、構造決定、及び転写阻害作用についての活性評価について述べる。

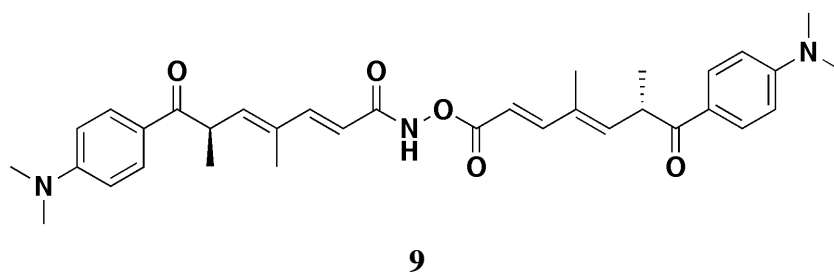
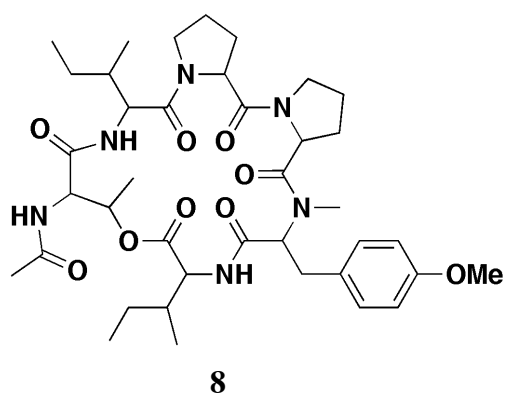


Figure 10. 本研究にて単離した2種の新規自然免疫応答抑制物質

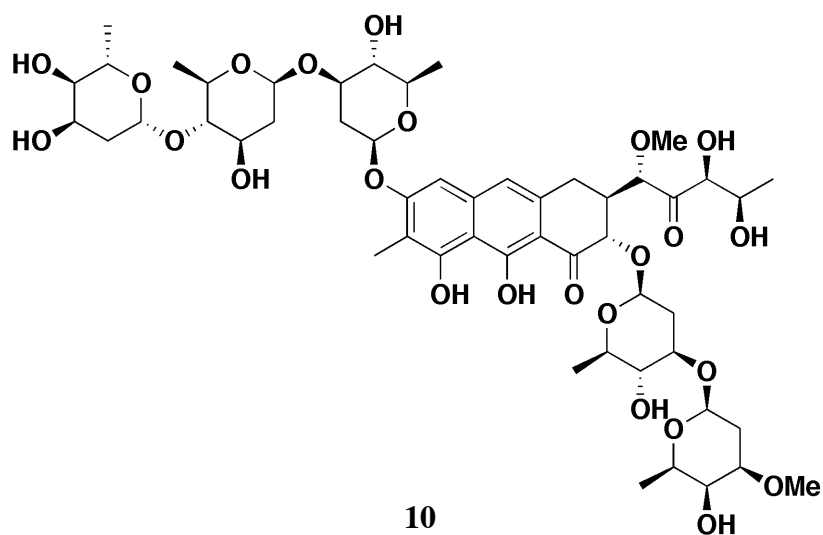


Figure 11. 本研究にて単離した新規転写阻害物質

本論

第 1 章 糸状菌 *Aspergillus* sp. に含まれる自然免疫応答抑制物質の探索

序論で述べたアッセイ系を用いたスクリーニングによって、2 種の微生物抽出物に自然免疫応答抑制作用を見出した。それら 2 種の活性抽出物のうち、糸状菌 *Aspergillus* sp. *n*-BuOH 抽出物から活性本体として新規デプシペプチド **8** を単離した。本章では、化合物 **8** の単離・構造決定及び生物活性評価について述べる。

第 1 節 *Aspergillus* sp. に含まれる自然免疫応答抑制物質 **8** の単離

糸状菌 *Aspergillus* sp. の培地を Figure 12 に示すように分配し、*n*-BuOH 可溶画分 5.96 g と H₂O 可溶画分 66.3 g を得た。それぞれの画分について *Dpt-lacZ* 系のアッセイを行ったところ、*n*-BuOH 可溶画分は 1000 µg/mL で自然免疫活性を 11.3% 程度まで抑制し、またその濃度では S2 細胞系において細胞毒性をほとんど示さなかった。一方、H₂O 可溶画分は 1000 µg/mL で自然免疫抑制活性を示さなかった。したがって、*n*-BuOH 可溶画分に自然免疫応答抑制物質が含まれていると考え、カラムクロマトグラフィーによる分画を行い、4 フラクションを得た (Figure 13)。得られたフラクションについて活性試験を行ったところ、Fr. 1~3 に自然免疫選択的な抑制作用が検出された。その後、活性の検出されたフラクションを *Dpt-lacZ* 系における活性を指標としてさらにカラムクロマトグラフィーにより分画した (Figure 14)。その結果、Fr. 2 から新規デプシペプチド **8** を自然免疫応答抑制物質として単離した。活性の検出された Fr. 1 および Fr. 3 の分画も行ったが、これらのフラクションから自然免疫応答抑制物質を単離することはできなかった。

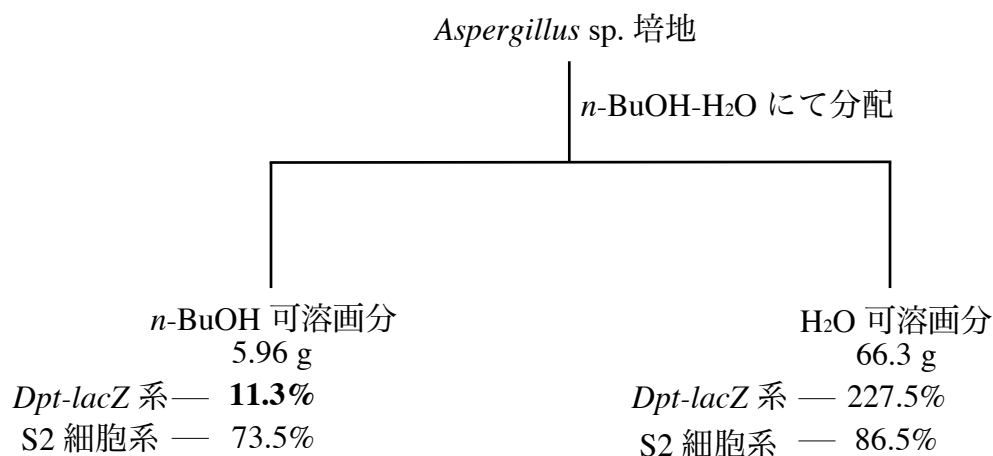


Figure 12. *Aspergillus* sp. の培地の分画 (1)

重量の下に数字はそれぞれ次の値を示す.

上: *Dpt-lacZ* 系における, 試料濃度 1000 µg/mL で添加したときの β-galactosidase 産生量 (% of control)

下: S2 細胞系における, 試料濃度 1000 µg/mL で添加したときの細胞生存率 (% of control)

なお, *Dpt-lacZ* 系で選択的に抑制作用を示したフラクションは活性の値を太字で示した.

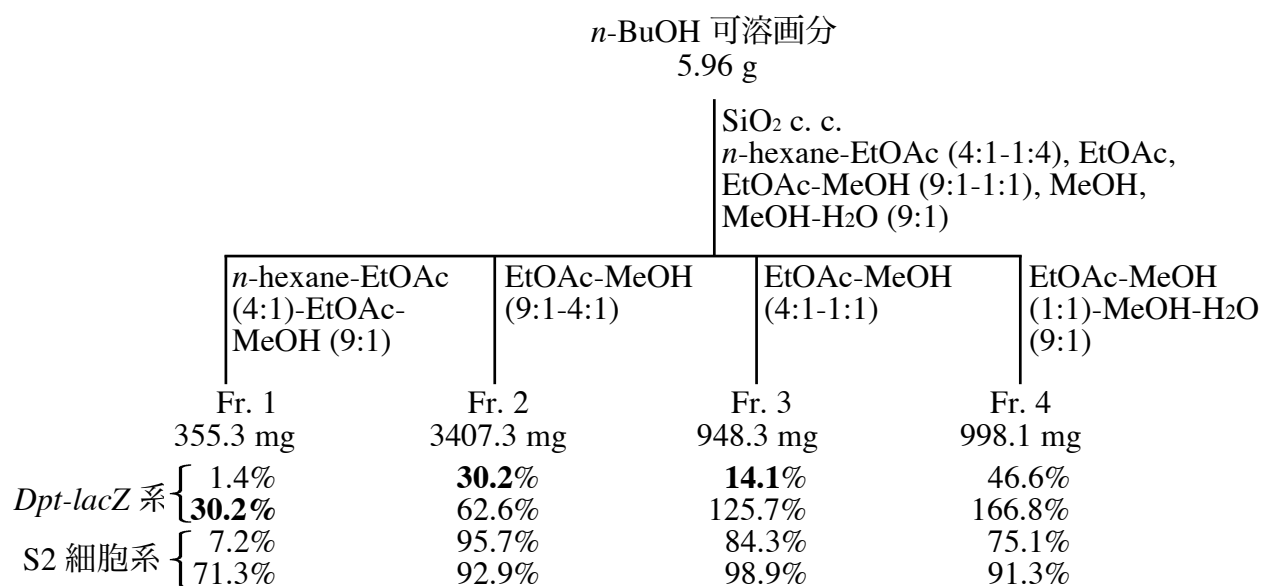


Figure 13. *Aspergillus* sp. の培地の分画 (2)

重量の下に数字はそれぞれ次の値を示す.

上 2 段: *Dpt-lacZ* 系における, 試料濃度 1000 µg/mL (上) 及び 100 µg/mL (下) で添加したときの β-galactosidase 産生量 (% of control)

下 2 段: S2 細胞系における, 試料濃度 1000 µg/mL (上) 及び 100 µg/mL (下) で添加したときの細胞生存率 (% of control)

なお, *Dpt-lacZ* 系で選択的に抑制作用を示したフラクションは活性の値を太字で示した.

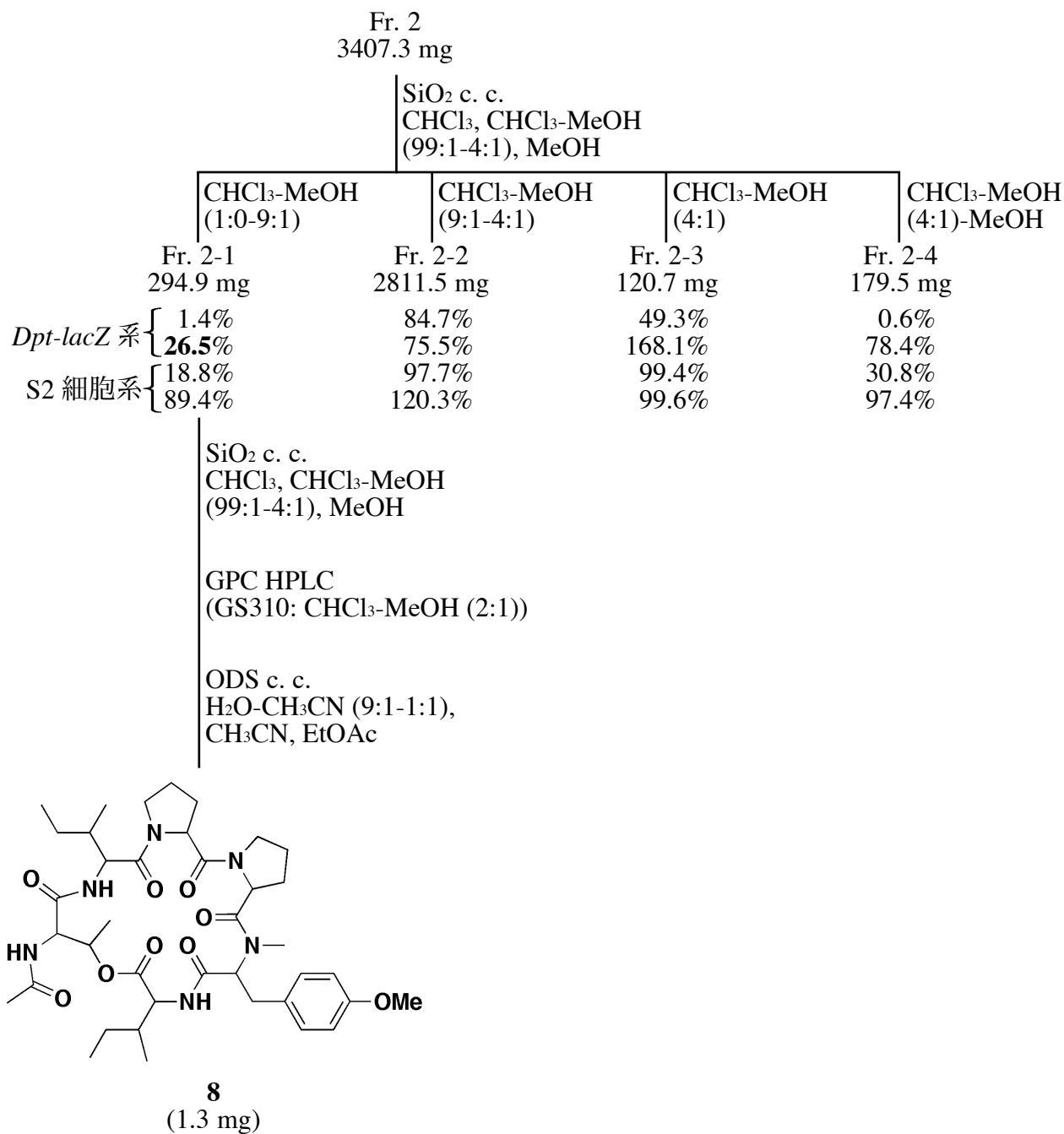


Figure 14. *Aspergillus* sp. の培地の分画 (3)

重量の下の数字はそれぞれ次の値を示す

上 2 段: *Dpt-lacZ* 系における, 試料濃度 1000 µg/mL (上) 及び 100 µg/mL (下) で
添加したときのβ-galactosidase 産生量 (% of control)

下 2 段: S2 細胞系における, 試料濃度 1000 µg/mL (上) 及び 100 µg/mL (下) で
添加したときの細胞生存率 (% of control)

なお, *Dpt-lacZ* 系で選択的に抑制作用を示したフラクションは活性の値を太字で示した.

第2節 化合物 8 の構造解析

第1項 平面構造の解析

化合物 8 は無色の油状物質として得られ、HRFABMS において m/z 755.4344 $[M+H]^+$ にピークが観測され、分子式 $C_{39}H_{58}N_6O_9$ と判明した。また、 1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC スペクトルより、7 個のカルボニル炭素 (d 173.2, 171.2, 171.1, 170.3, 170.1, 169.7, 168.4), 2 個の 4 級 sp^2 炭素 (d 158.7, 129.7), 4 個の sp^2 メチン炭素 (d 130.5 (2C), 114.4 (2C)), 9 個のメチン炭素 (d 71.6, 62.5, 58.3, 57.6, 55.8, 55.2, 54.7, 37.7, 36.9), 1 個のメトキシ炭素 (d 55.4), 1 個の窒素原子に結合したメチル炭素 (d 29.4), 9 個のメチレン炭素 (d 47.6, 47.4, 33.5, 28.5, 27.9, 26.1, 25.4, 24.8, 24.7), 6 個のメチル炭素 (d 23.1, 16.7, 15.7, 14.5, 11.7, 11.1) の存在が判明した。

まず、 1H - 1H COSY により、2 位と 3 位の炭素の結合、および 5 位と 6 位の炭素の結合が明らかになった。続いて、HMBC スペクトルによる C-H 間のロングレンジカップリングを測定したところ、1 位の炭素から 2 位の水素への相関、2 位の炭素から 11 位の水素への相関、3 位の炭素から 5 位の水素への相関、7 位の炭素から 10 位の水素への相関が観測されたことから、以下のような部分構造 (1) (*N,O*-dimethyl-Tyr) が得られた (Figure 15)。

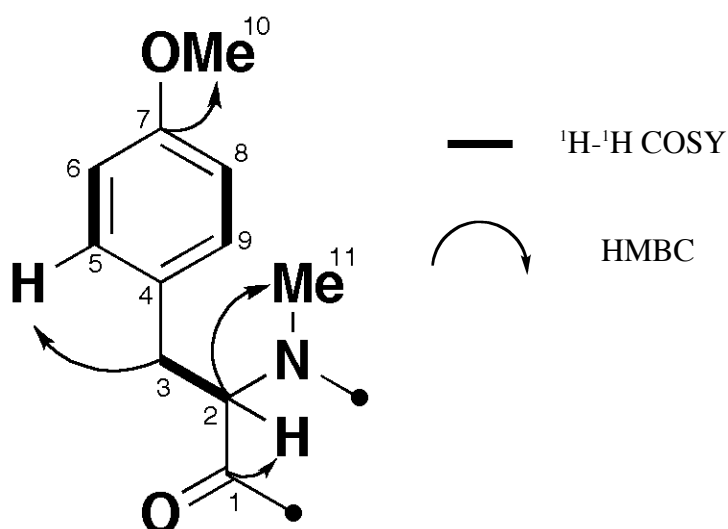


Figure 15. 化合物 8 の部分構造 (1)

また、 ^1H - ^1H COSY により、13 位の炭素から 16 位の炭素までの結合が明らかになった。続いて、HMBC スペクトルによる C-H 間のロングレンジカップリングを測定したところ、12 位の炭素から 14 位の水素への相関が観測されたことから、以下のような部分構造 (2) (Pro) が得られた (Figure 16).

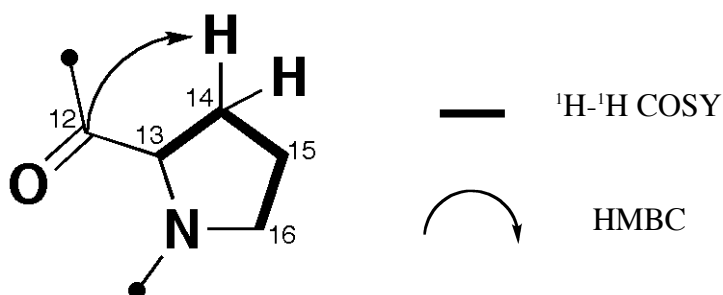


Figure 16. 化合物 **8** の部分構造 (2)

また、 ^1H - ^1H COSY により、18 位の炭素と 19 位の炭素の結合、および 20 位と 21 位の炭素の結合が明らかになった。続いて、HMBC スペクトルによる C-H 間のロングレンジカップリングを測定したところ、17 位の炭素から 19 位の水素への相関、21 位の炭素から 19 位の水素への相関が観測されたことから、以下のような部分構造 (3) (Pro) が得られた (Figure 17).

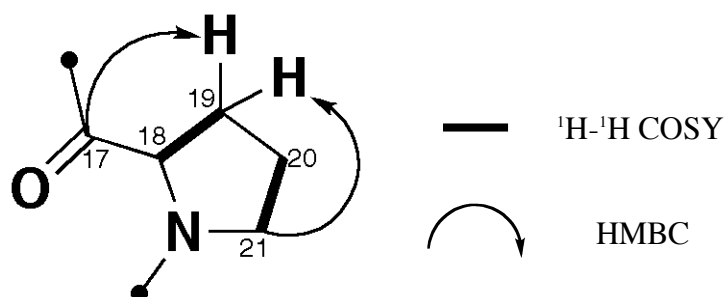


Figure 17. 化合物 **8** の部分構造 (3)

また、 ^1H - ^1H COSY により、23 位の炭素から 27 位までの炭素の結合が明らかになった。続いて、HMBC スペクトルによる C-H 間のロングレンジカップリングを測定したところ、22 位の炭素から 23 位の水素への相関が観測されたことから、以下のような部分構造 (4) (Ile) が得られた (Figure 18)。

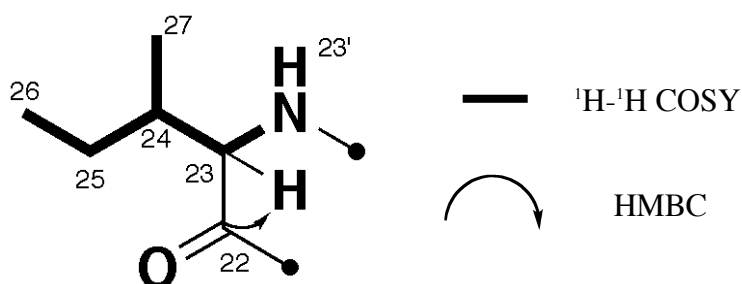


Figure 18. 化合物 **8** の部分構造 (4)

また、 ^1H - ^1H COSY により、29 位の炭素から 31 位の炭素までの結合が明らかになった。続いて、HMBC スペクトルによる C-H 間のロングレンジカップリングを測定したところ、28 位の炭素から 29 位の水素への相関、32 位の炭素から 29' 位の水素及び 33 位の水素への相関が観測されたことから、以下のような部分構造 (5) (*N*-acetyl-Thr) が得られた (Figure 19)。

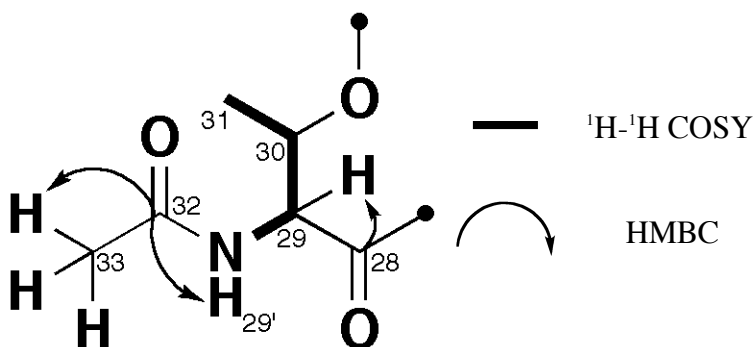


Figure 19. 化合物 **8** の部分構造 (5)

また、 ^1H - ^1H COSY により、36 位と 37 位の炭素の結合、および 36 位と 39 位の炭素の結合が明らかになった。続いて、HMBC スペクトルによる C-H 間のロングレンジカップリングを測定したところ、34 位の炭素から 35 位の水素への相関、36 位の炭素から 38 位の水素及び 39 位の水素への相関、37 位の炭素から 38 位の水素への相関が観測されたことから、以下のような部分構造 (6) (Ile) が得られた (Figure 20).

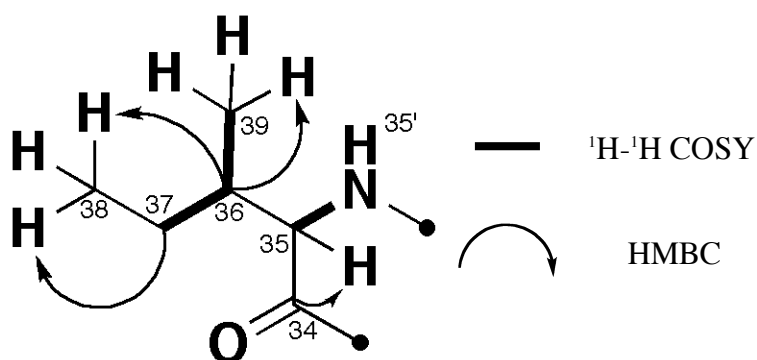


Figure 20. 化合物 8 の部分構造 (6)

また、28 位の炭素から 23' 位の水素への相関、34 位の炭素から 30 位の水素への相関、1 位の炭素から 35' 位の水素への相関、12 位の炭素から 11 位の水素への相関が観測されたことから、部分構造 (1), (2), (4), (5), (6) の連結が判明した (Figure 21).

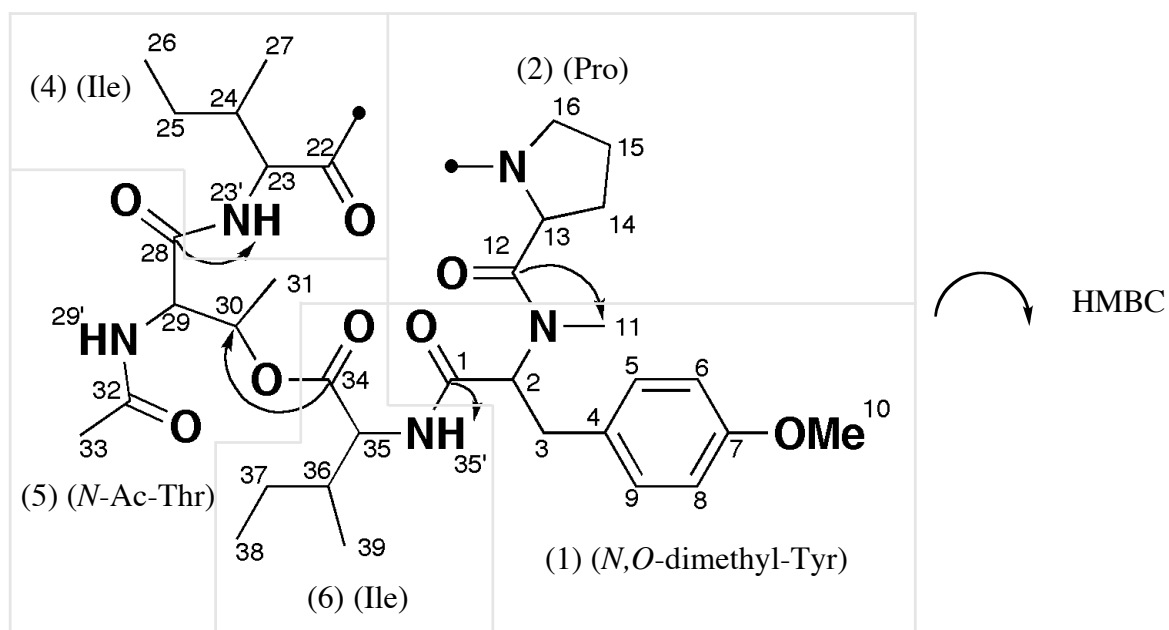


Figure 21. 部分構造の連結

残りの部分構造 (3) の位置は、部分構造 (2) と (4) の間以外はあり得ないので以下のように平面構造が決定した。この平面構造は過去に *Aspergillus carneus* より単離された環状デプシペプチド aspergillicin E (**11**)¹⁷ と同一であった (Figure 22).

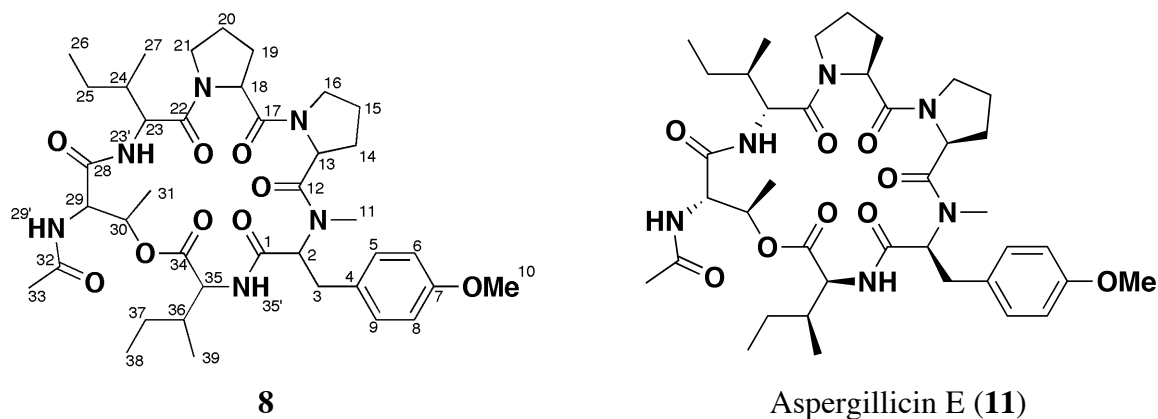


Figure 22. 化合物 **8** 及び Aspergillicin E (**11**) の構造

そこで化合物 **8** の ¹H NMR の値と aspergillicin E の文献値¹⁷ とを比較したところ、ほとんどは一致しているものの、aspergillicin E (**11**) の L-allo-Ile の α 位に対応する 35 位のシグナルが化合物 **8** では 0.16 ppm 高磁場側にシフトしていた。また、aspergillicin E (**11**) の N-Ac-L-Thr におけるアミノ基に対応する 29'-NH 位のシグナルが化合物 **8** では 0.22 ppm 低磁場側にシフトしていた (Table 1)。この 2 カ所でシグナルの位置が大きく変化していることから、化合物 **8** の構造として aspergillicin E (**11**) の L-allo-Ile が L-Ile, D-Ile, D-allo-Ile のいずれかに換わった構造、または N-Ac-L-Thr が N-Ac-D-Thr に換わった構造、もしくはどちらも換わった構造が考えられる。これらのうち、L-allo-Ile が L-Ile に換わった構造以外は、いずれも L-体のアミノ酸だった部位が D-体のアミノ酸になるため、分子全体の立体構造が大きく変化し、上述の 2 カ所以外のシグナル位置も大きく変化すると考えられる。このことから、化合物 **8** の構造は aspergillicin E (**11**) の L-allo-Ile が L-Ile に換わった構造であると推測された (Figure 23)。

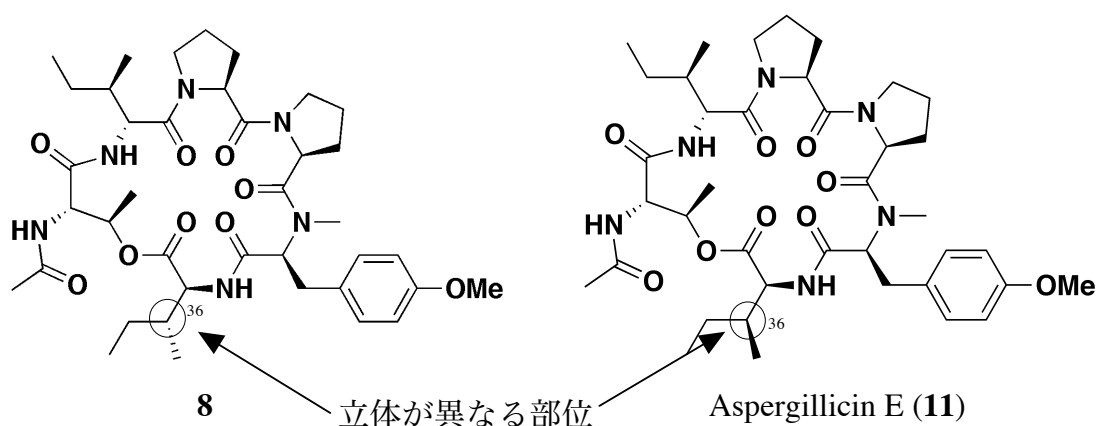
Table 1. **8** 及び aspergillicin E (**11**) の NMR データ

Position	¹³ C (ppm) ^a	¹ H (ppm) ^a	
	8	8	Aspergillicin E (11) ¹⁷
			<i>N,O</i> -dimethyl-L-Tyr
1	169.7		
2	62.5	4.97 (1H, dd, <i>J</i> = 11.1, 3.0 Hz)	4.97 (1H, dd, <i>J</i> = 11.2, 3.6 Hz)
3	33.5	3.15 (1H, dd, <i>J</i> = 14.9, 3.0 Hz)	3.17 (1H, dd, <i>J</i> = 14.6, 3.4 Hz)
		2.95 (1H, dd, <i>J</i> = 14.9, 11.1 Hz)	2.98 (1H, dd, <i>J</i> = 14.6, 11.4 Hz)
4	129.7		
5	130.5	7.02 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	7.03 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)
6	114.4	6.82 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	6.84 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)
7	158.7		
8	114.4	6.82 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	6.84 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)
9	130.5	7.02 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	7.03 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)
10	55.4	3.76 (3H, s)	3.78 (3H, s)
11	29.4	2.81 (3H, s)	2.83 (3H, s)
			L-Pro
12	173.2		
13	55.2	4.30 (1H, dd, <i>J</i> = 8.1, 5.1 Hz)	4.30 (1H, dd, <i>J</i> = 7.8, 5.0 Hz)
14	28.5	1.03-1.84 (2H, m)	1.0-1.8 (2H, m)
15	24.7	1.85-2.04 (2H, m)	1.8-2.3 (1H, m)
			1.0-1.8 (1H, m)
16	47.6	3.57-3.72 (2H, m)	3.6-3.7 (2H, m)
			L-Pro
17	170.1		
18	58.3	4.48 (1H, dd, <i>J</i> = 8.5, 5.1 Hz)	4.50 (1H, dd, <i>J</i> = 8.6, 5.0 Hz)
19	27.9	2.13-2.23 (1H, m)	1.8-2.3 (2H, m)
		1.81-1.92 (1H, m)	
20	25.4	1.63-1.71 (2H, m)	1.8-2.3 (2H, m)
21	47.4	3.49 (2H, m)	3.49 (2H, m)
			D- <i>allo</i> -Ile
22	171.2		
23	54.7	4.61 (1H, dd, <i>J</i> = 9.7, 8.0 Hz)	4.61 (1H, dd, <i>J</i> = 9.6, 7.6 Hz)
24	37.7	1.56-1.68 (2H, m)	1.0-1.8 (1H, m)
25	26.1	1.02-1.85 (2H, m)	1.0-1.8 (2H, m)
26	11.7	0.82-0.96 (3H, m)	0.83-0.95 (3H, m)
27	14.5	0.84-0.96 (3H, m)	0.83-0.95 (3H, m)
23'-NH		6.57 (1H, d, <i>J</i> = 9.7 Hz)	6.61 (1H, d, <i>J</i> = 9.6 Hz)

Table 1. **8** 及び aspergillicin E (**11**) の NMR データ (つづき)

Position	¹³ C (ppm) ^a	¹ H (ppm) ^a	
	8	8	Aspergillicin E (11) ¹⁷
			<i>N</i> -Ac-L-Thr
28	168.4		
29	55.8	4.84 (1H, dd, <i>J</i> = 9.7, 2.4 Hz)	4.86 (1H, dd, <i>J</i> = 10.0, 2.4 Hz)
30	71.6	5.56 (1H, dq, <i>J</i> = 6.5, 2.4 Hz)	5.60 (1H, dq, <i>J</i> = 6.5, 2.4 Hz)
31	16.7	1.26 (3H, d, <i>J</i> = 6.5 Hz)	1.28 (3H, d, <i>J</i> = 6.4 Hz)
32	171.1		
33	23.1	2.13 (3H, s)	2.16 (3H, s)
29'-NH		<u>7.03 (1H, d, <i>J</i> = 9.7 Hz)</u>	<u>6.81 (1H, d, <i>J</i> = 10.0 Hz)</u>
			<i>L</i> -allo-Ile
34	170.3		
35	57.6	<u>4.52 (1H, dd, <i>J</i> = 8.8, 5.6 Hz)</u>	<u>4.68 (1H, dd, <i>J</i> = 9.2, 4.8 Hz)</u>
36	36.9	1.83-1.97 (1H, m)	1.8-2.3 (1H, m)
37	57.6	1.82-2.06 (2H, m)	1.0-1.8 (2H, m)
38	11.1	0.74-0.86 (3H, m)	0.83-0.95 (3H, m)
39	15.7	0.81-0.95 (3H, m)	0.83-0.95 (3H, m)
35'-NH		8.13 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	8.16 (1H, d, <i>J</i> = 9.2 Hz)

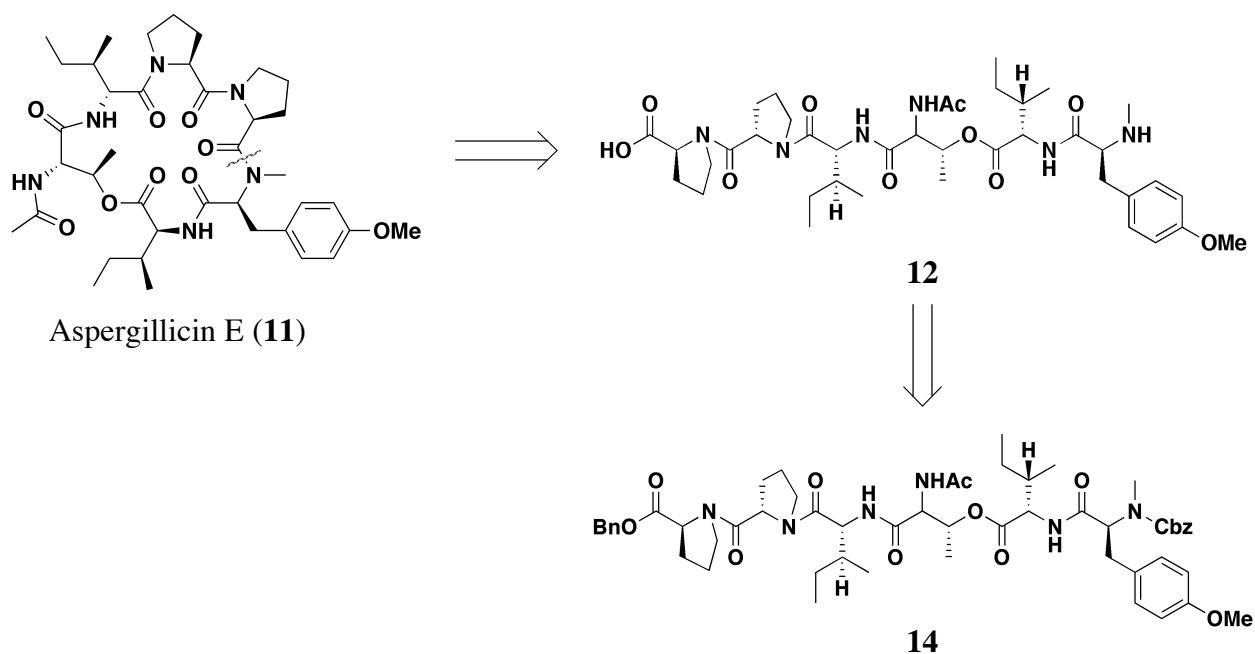
^a Compound **8**: 600 MHz for ¹H and 150 MHz for ¹³C in CDCl₃.

Figure 23. 化合物 **8** の推定構造及び aspergillicin E (**11**) の構造

第2項 Aspergillicin E (11) の合成

前項で述べた化合物 **8** の推定構造の合成を行う前に、まず合成法の確立を目的として、aspergillicin E (**11**) の合成を行うことにした。

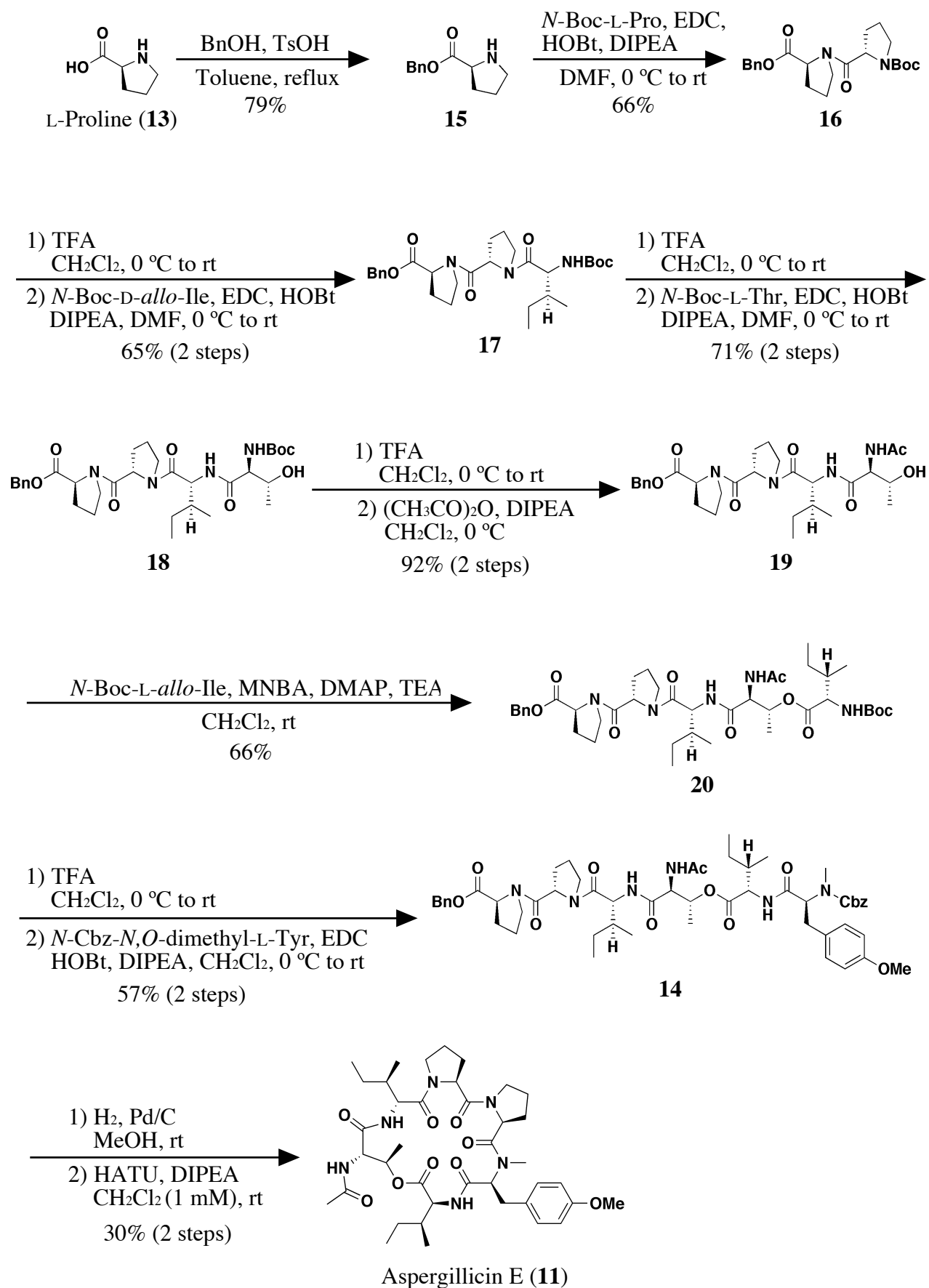
環状ペプチドの合成において閉環反応は、二量化や C 末端のアミノ酸のエピマー化などの副反応が起こりやすいことが知られているが、¹⁸ C 末端に Gly または Pro を用いることで効率よく閉環反応を行うことができると報告されている。¹⁹ そこで、本合成では化合物 **12** の Pro のカルボキシ基と Tyr のメチルアミノ基との間で縮合させることで環化を行うことにした。環化前駆体 **12** の合成についてもエピマー化の恐れがあるため、セグメント縮合を避けて、L-Pro (**13**) を原料としてカルボキシ基をベンジル基で保護した後、L-Pro, D-allo-Ile, L-Thr, L-allo-Ile, L-Tyr と直線的に順次縮合させてヘキサペプチド **14** を合成し、接触還元することで導くことにした (Scheme 1)。



Scheme 1. Aspergillicin E (**11**) の逆合成解析

上述した逆合成解析に基づいて、以下のように aspergillicin E (**11**) の合成を行った。初めに、L-Pro (**13**) を原料に benzyl alcohol を用いてカルボキシ基を保護して **15** に変換した後、EDC を用いて *N*-Boc-L-Pro と縮合させて **16** を得た。続いて酸処理により Boc 基の脱保護を行った後、EDC を用いて *N*-Boc-D-*allo*-Ile, と縮合させ **17** を合成した。同様の方法で **17** と *N*-Boc-L-Thr と縮合させテトラペプチド **18** を合成した。そして、**18** の Boc 基をアセチル基に変換して **19** へ誘導し、MNBA を用いて *N*-Boc-L-*allo*-Ile と縮合させ **20** を得た。さらに酸処理による脱保護、*N*-Cbz-*N,O*-dimethyl-L-Tyr との縮合を続けて行い、aspergillicin E (**11**) に対応するヘキサペプチド **14** を得た。最後に、水素雰囲気下、Pd/C を触媒として接触還元を行った後、高度希釈条件下で HATU を用いて環化を行うことで,²⁰ aspergillicin E (**11**) の合成を達成した (Scheme 2)。

以上のように合成した **11** と過去に報告された aspergillicin E (**11**) の文献の各種 NMR スペクトルデータを比較したところ、合成した **11** の NMR スペクトルデータは文献の値と完全に一致した。また化合物 **8** と比較したところ、前項で述べたのと同様に 29'-NH 位および 35 位でシフト値が異なっていた (Figure 24)。以上のことより aspergillicins の合成法を確立した。また化合物 **8** の相対構造が aspergillicin E (**11**) とは異なるということを確認できた。



Scheme 2. Aspergillicin E (**11**) の合成

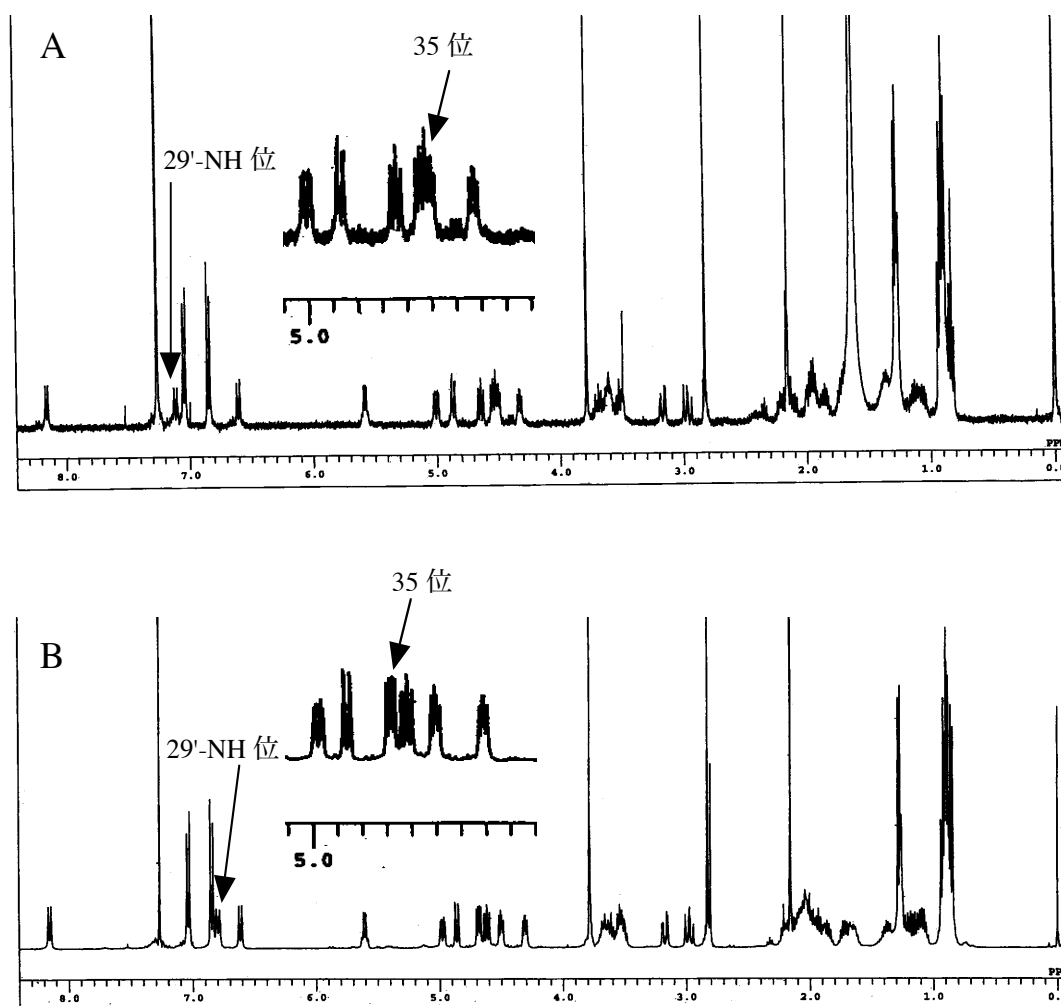


Figure 24. (A) 化合物 **8** および (B) aspergillicin E (**11**) の ^1H NMR スペクトル

第3節 新規デプシペプチド **8** および aspergillicin E (**11**) の活性評価

第1節にて得られた新規デプシペプチド **8** および第2節にて合成した aspergillicin E (**11**) についてショウジョウバエを用いた自然免疫応答抑制作用の評価を行った。

化合物 **8** は *Dpt-lacZ* 系のアッセイでは 1 $\mu\text{g/mL}$ から濃度依存的に抑制作用を示した。 *hs-lacZ* 系のアッセイでは 100 $\mu\text{g/mL}$ においても抑制作用を示さなかった。 S2 細胞系において 10 $\mu\text{g/mL}$ でおよそ 80% の細胞生存率となったが、100 $\mu\text{g/mL}$ においても細胞生存率の更なる低下は認められなかった (Figure 25A)。 よって、化合物 **8** は、自然免疫応答抑制作用を有することが判明した。

Aspergillicin E (**11**) は *Dpt-lacZ* 系および *hs-lacZ* 系のアッセイでは 100 $\mu\text{g/mL}$ においても抑制作用を示さなかった。 S2 細胞系において 10 $\mu\text{g/mL}$ から毒性を示し、100 $\mu\text{g/mL}$ において細胞生存率は 60% 程度の細胞生存率を示した (Figure 25B) よって、aspergillicin E (**11**) は自然免疫応答を抑制しないと考えられる。

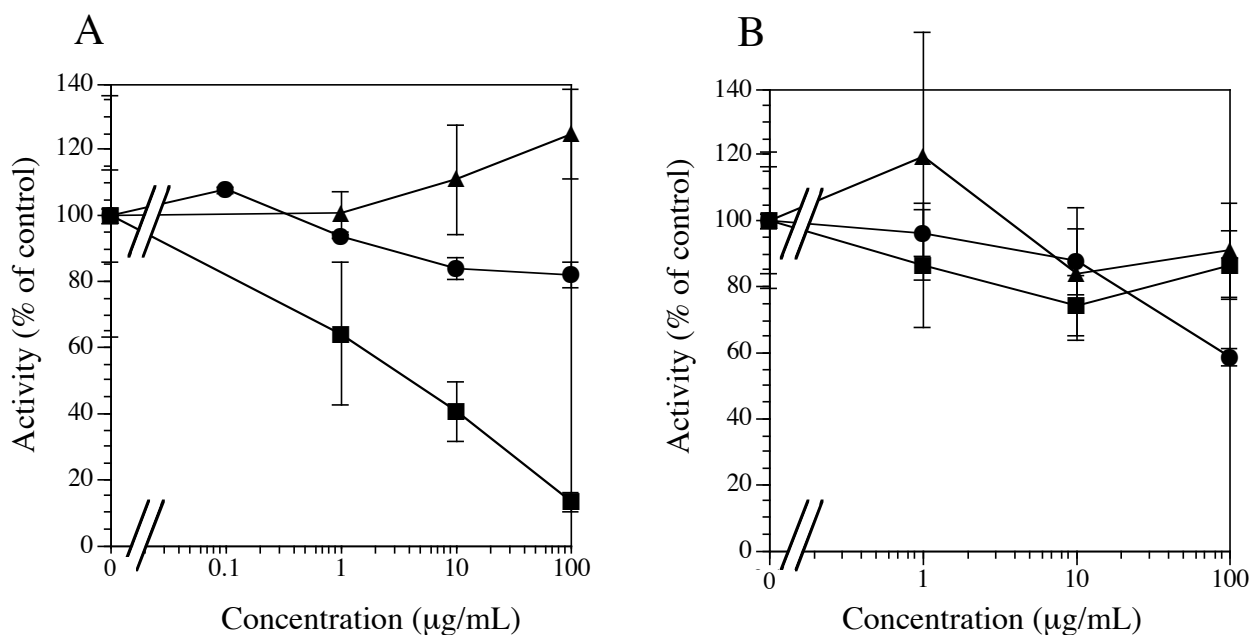


Figure 25. ショウジョウバエを用いた自然免疫応答抑制作用の評価
(A) 化合物 **8**, (B) Aspergillicin E (**11**)

縦軸の値は DMSO 添加時の

Dpt-lacZ 系 (n=6) ■: 1 $\mu\text{g/mL}$ の PGN を培地に添加したときの β -galactosidase/protein (ng/mg),

hs-lacZ 系 (n=6) ▲: 1 $\mu\text{g/mL}$ の PGN を培地に添加したときの β -galactosidase/protein (ng/mg),

S2 細胞系 (n=4) ●: 生細胞数 (Abs. OD450 (4h - 0h)),

の平均値を 100 とし、横軸の試料の濃度に対する相対値で表した。各試料は DMSO に溶解させて培地に添加した。

序論でも述べたように、ショウジョウバエの自然免疫活性化機構 imd 経路は、アダプター分子、キナーゼ、転写因子などの構成因子がヒトの自然免疫活性化機構 TNF 経路の構成因子と非常に類似していることが知られている。⁵ このことから、ショウジョウバエの自然免疫に作用する化合物はヒトの自然免疫にも作用すると考えられる。そこで、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いてヒトの自然免疫に対する化合物 **8** の作用を検討した。

IL-8 は HUVEC が TNF 経路を介して産生するサイトカインであり、異物排除の初期段階で見られる。そこで、TNF 経路に対する作用を評価する目的で、HUVEC を化合物 **8** で 1.5 時間前処理したのち、TNF- α 1 ng/mL で刺激して、12 時間後の IL-8 の誘導産生量を ELISA 法により評価した。

その結果、化合物 **8** はほとんど IL-8 産生抑制作用を示さず、また細胞毒性も示さなかった。したがって、化合物 **8** はヒト細胞にはほとんど自然免疫応答抑制作用を有していないことが明らかとなった (Figure 26)。

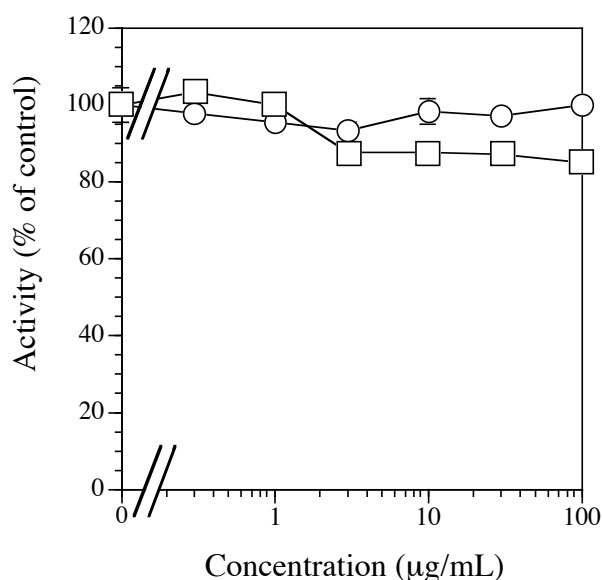


Figure 26. 化合物 **8** のサイトカイン産生抑制作用

縦軸の値は DMSO 添加時の

ELISA 法 (n=4) □: TNF- α 1 ng/mL で刺激し 12 時間後の培地に含まれる IL-8 の産生量,

HUVEC MTT 法 (n=4) ○: 生細胞数 (Abs. OD450 (4h-0h))

の平均値を 100 とし、横軸の化合物の濃度に対する相対値で表した。化合物は DMSO に溶解させて培地に添加した。

第4節 考察

本章では、糸状菌 *Aspergillus* sp. の培地 *n*-BuOH 可溶画分から自然免疫応答抑制作用を有する化合物 **8** を単離した。また化合物 **8** と同一の平面構造を有する既知の環状デブシペプチド aspergillicin E (**11**) の合成を達成し、aspergillicins の合成法を確立した。

Aspergillicin E (**11**) は 2003 年に放線菌 *Aspergillus carneus* より単離された化合物であり、類縁体としては同一の菌株より単離された aspergillicin A-D (**21-24**) が報告されているが²²、今までのところこれらの化合物について顕著な生物活性は報告されていない (Figure 27)。

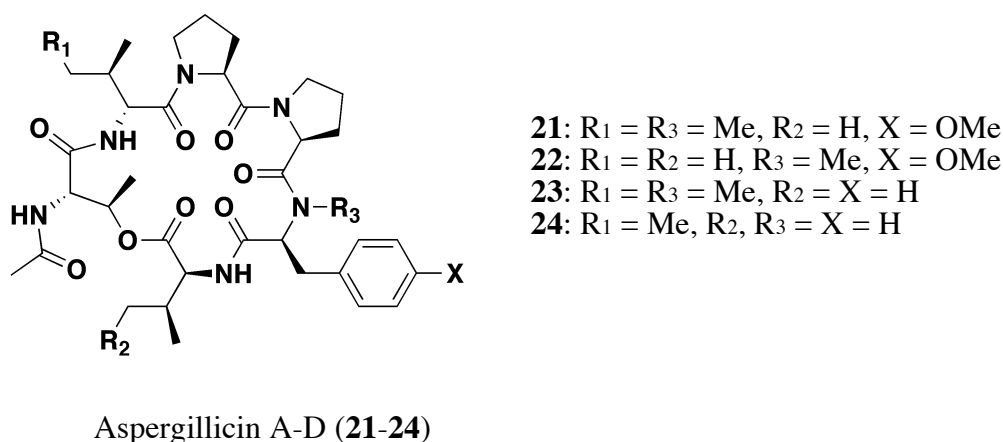


Figure 27. Aspergillicin E (**11**) の類縁体

第2節で述べたように、化合物 **8** の構造は aspergillicin E (**11**) の L-*allo*-Ile が L-Ile に置き換わった構造であると推測される。しかし、活性評価を行ったところ、化合物 **8** はショウジョウバエに対し自然免疫応答抑制作用を示したものの aspergillicin E (**11**) は自然免疫応答抑制作用を全く示さなかった。この結果から、化合物 **8** の 35 位の立体が活性発現に重要であることが示唆されるが、さらなる検討が必要である。化合物 **8** の絶対構造は未決定であるため、まず、aspergillicin E (**11**) の合成と同様の方法で推定構造を合成し、天然物と合成品の ¹H NMR 及び ¹³C NMR を比較することにより化合物 **8** の相対構造を決定する方針である。絶対構造については相対構造が決定した後、天然物と合成品で比旋光度を比較して決定する。さらに、aspergillicin A-D (**21-24**) や aspergillicin E (**11**) のジアステレオマーなどさらなる誘導体も同様の方法で合成し、活性評価を行うことで、構造活性相関研究が

進むことが期待される。

また、化合物 **8** はショウジョウバエに対しては自然免疫応答抑制作用を示したが、HUVEC に対する活性評価では細胞生存率およびサイトカイン産生量にほとんど影響を及ぼさなかった。ヒトとショウジョウバエの自然免疫活性化機構は非常に高い相同性を有するが、作用機序や標的分子、あるいは感受性においてわずかな違いが存在し、その違いによってこのような結果が得られたと考えられる。今後、化合物 **8** の自然免疫応答抑制作用の作用点を解析することで、ヒトとショウジョウバエで異なる作用が生じた原因の解明が進むことが期待される。

第 2 章

放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* に含まれる自然免疫応答抑制物質の探索

序論で述べたアッセイ系を用いたスクリーニングによって、2 種の微生物抽出物に自然免疫応答抑制作用を見出した。それら 2 種の活性抽出物のうち、放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* *n*-BuOH 抽出物から新規 trichostatin 誘導体 **9** を自然免疫応答抑制物質として単離した。本章では、化合物 **9** の単離・構造決定及び生物活性評価について述べる。

第 1 節 *Streptomyces hygroscopicus* に含まれる自然免疫応答抑制物質 **9** の単離

放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* *n*-BuOH 抽出物は、*Att-luc* 系のアッセイによって 0.1 $\mu\text{g/mL}$ から抑制作用を示し、10 $\mu\text{g/mL}$ で 90% の抑制を示した。また S2 細胞系において 1 $\mu\text{g/mL}$ から細胞毒性を示し、100 $\mu\text{g/mL}$ で 70% 程度の細胞生存率となった (Figure 28)。したがって、この抽出物は選択性が低いものの自然免疫応答抑制作用を有すると判断し、活性成分の分画を行った。

n-BuOH 抽出物 92.92 g を Figure 29 に示すように分配し、EtOAc 可溶画分 52.73 g, *n*-BuOH 可溶画分 34.10 g と H₂O 可溶画分 12.61 g を得た。それぞれの画分について *Att-luc* 系のアッセイを行ったところ、EtOAc 可溶画分および *n*-BuOH 可溶画分は 1 $\mu\text{g/mL}$ で 65% 程度の抑制を示し、またその濃度では S2 細胞系において EtOAc 可溶画分のみ 35% 程度の細胞毒性を示した。一方、H₂O 可溶画分は 1 $\mu\text{g/mL}$ で自然免疫抑制活性を示さなかった。したがって、EtOAc 可溶画分および *n*-BuOH 可溶画分に自然免疫応答抑制物質が含まれていると考え、まず EtOAc 可溶画分をカラムクロマトグラフィーによって分画を行い、6 フラクシオンを得た。得られたフラクシオンについて、*Att-luc* 系のアッセイを行ったところ、Fr. 3~6 に抑制作用が検出された。

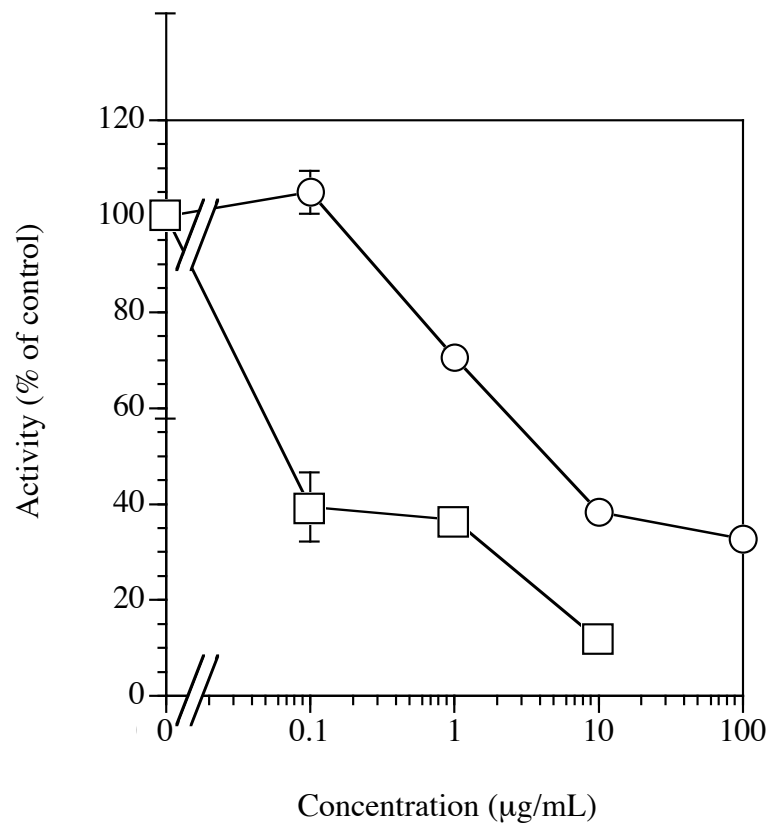


Figure 28. *Streptomyces hygroscopicus* n-BuOH 抽出物の自然免疫応答抑制作用

縦軸の値は DMSO 添加時の

Att-luc 系 (n=6) □: 100 ng/mL の PGN を培地に添加したときの luciferase

S2 細胞系 (n=4) ○: 生細胞数 (Abs. OD450 (4h - 0h)),

の平均値を 100 とし、横軸の試料の濃度に対する相対値で表した。各試料は DMSO に溶解させて培地に添加した。

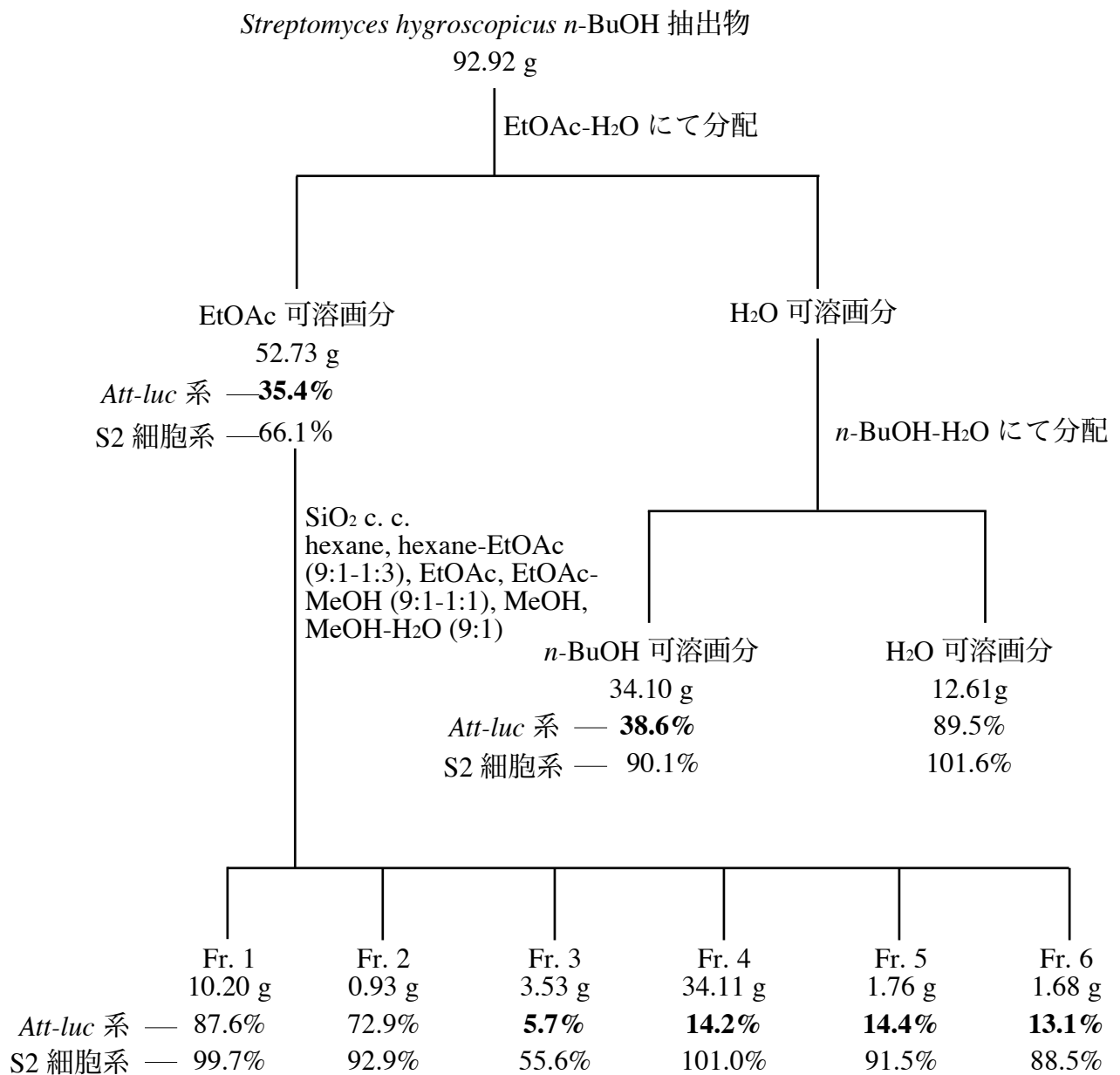


Figure 29. *Streptomyces hygroscopicus* *n*-BuOH 抽出物の分画 (1)

重量の下に数字はそれぞれ次の値を示す.

上: *Att-luc* 系における, 試料濃度 1 µg/mL で添加したときの luciferase 産生量 (% of control)

下: S2 細胞系における, 試料濃度 1 µg/mL で添加したときの細胞生存率 (% of control)

なお, *Att-luc* 系 で選択的に抑制作用を示したフラクションは活性の値を太字で示した.

活性の検出されたフラクションは *Att-luc* 系における活性を指標としてさらにカラムクロマトグラフィーにより分画した (Figure 30). その結果, Fr. 3 から新規 trichostatin 誘導体 **9** および trichostatin A (**25**) を単離し, *Att-luc* 系において自然免疫応答抑制作用を示すことが明らかとなった. また, 分画の過程で trichostatic acid (**26**) を単離したが, 自然免疫応答抑制作用は示さなかった. Fr. 3 以外に活性が検出された Fr. 4~6 および *n*-BuOH 可溶画分についても, *Att-luc* 系における活性を指標として分画を行った結果, いずれのフラクションからも trichostatin A (**25**) が自然免疫応答抑制物質として単離された. Trichostatin A (**25**) および trichostatic acid (**26**) はそれぞれの ^1H NMR 及び ^{13}C NMR の値と, 文献値²¹ を比較したところ一致したため, その構造を決定した.

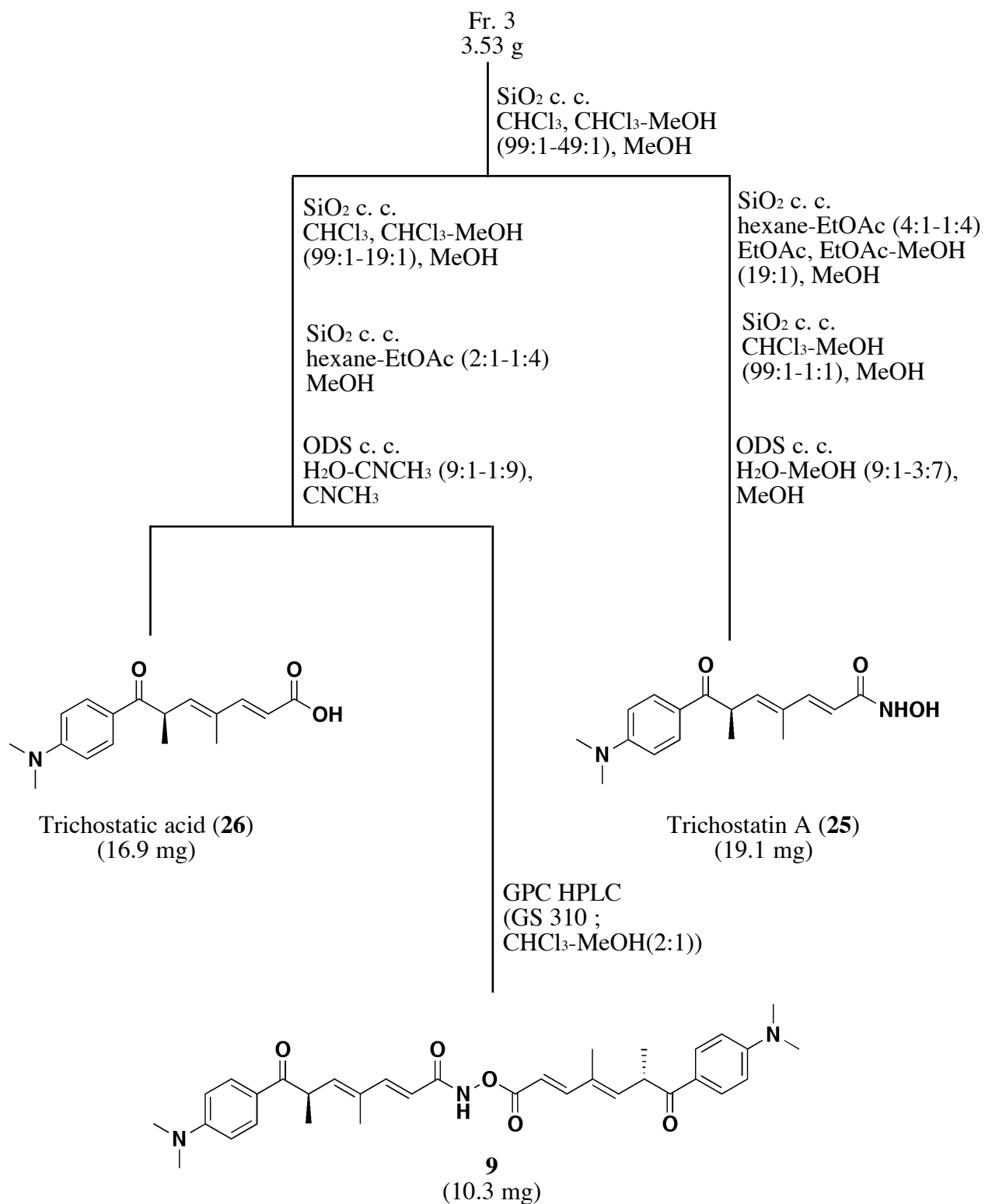
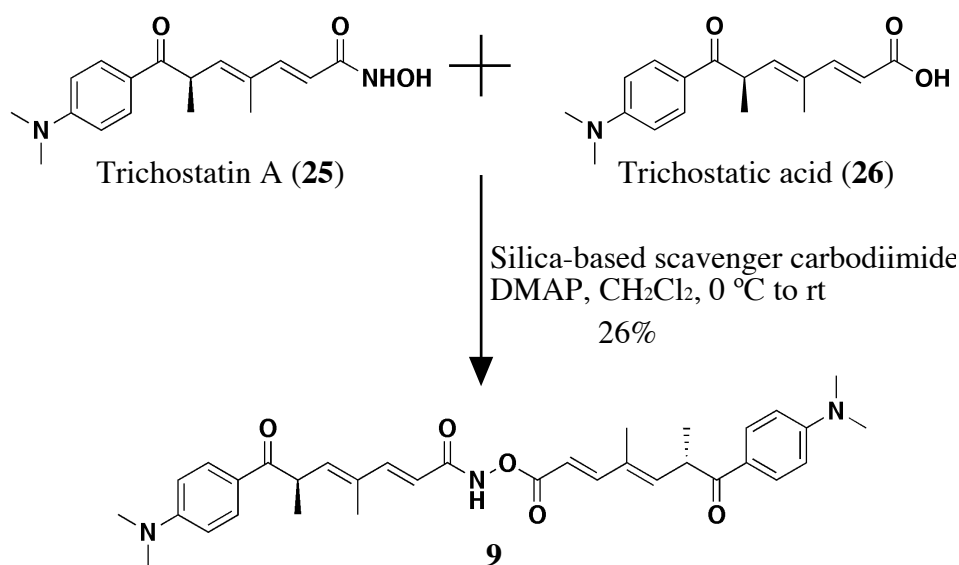


Figure 30. *Streptomyces hygroscopicus* *n*-BuOH 抽出物の分画 (2)

第2節 化合物 9 の構造解析

化合物 9 は黄色の油状物質として得られ、HRFABMS より m/z 572.3318 $[M+H]^+$ にピークが観測され、分子式 $C_{34}H_{42}N_3O_5$ と判明した。この分子式はちょうど trichostatin A (25) と trichostatic acid (26) を足して H_2O を 1つ除いた分子式と一致し、さらに 1H NMR および ^{13}C NMR スペクトルにおいても trichostatin A (25) と trichostatic acid (26) のピークを足し合わせたようなピークが観測された。したがって、化合物 9 は trichostatin A (25) のヒドロキシアミノカルボキシル基と trichostatic acid (26) のカルボキシル基で脱水縮合した構造であると推定された。そこで、天然物の trichostatin A (25) と trichostatic acid (26) を縮合して化合物 9 を合成し、天然物と合成品の 1H NMR および ^{13}C NMR の値を比較することにより構造を決定することにした。

化合物 9 は構造中にジメチルアミノ基を有しており、通常の縮合反応のように反応操作の後処理に塩酸などを用いた場合、塩を形成して有機溶媒で抽出できなくなってしまう恐れがあった。そこで、濾過することで残った縮合剤を除去することが出来る silica-based scavenger carbodiimide を用いて、合成を行った (Scheme 3)。そして、合成した 9 と天然物の 9 の各種 NMR データを比較したところ、完全に一致した (Table 2)。このことより、化合物 9 の構造は trichostatin A (25) と trichostatic acid (26) が脱水縮合した構造であることが判明した。



Scheme 3. 化合物 9 の合成

Table 2. 化合物 **9**, trichostatin A (**25**) および trichostatic acid (**26**) の NMR データ

Position	¹³ C (ppm) ^a	¹ H (ppm) ^a	
	9	9	Trichostatin A (25) (1-16) Trichostatic acid (26) (1'-16')
1	165.5		
2	111.6	5.97 (1H, d, <i>J</i> = 15.6 Hz)	5.82 (1H, d, <i>J</i> = 15.5 Hz)
3	152.5	7.47 (1H, d, <i>J</i> = 15.6 Hz)	7.18 (1H, d, <i>J</i> = 15.5 Hz)
4	132.2		
5	144.4	6.15 (1H, d, <i>J</i> = 9.6 Hz)	5.91 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz)
6	40.9	4.38 (1H, m)	4.31 (1H, m)
7	198.1		
8	123.8		
9	130.6	7.84 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	7.81 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)
10	110.7	6.64 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	6.60 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)
11	153.5		
12	110.7	6.64 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	6.60 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)
13	130.6	7.84 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	7.81 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)
14	12.3	1.93 (1H, d, <i>J</i> = 1.2 Hz)	1.79 (1H, s)
15	17.5	1.31 (1H, d, <i>J</i> = 6.6 Hz)	1.25 (1H, d, <i>J</i> = 6.8 Hz)
16	40.0	3.05 (3H, s)	3.00 (3H, s)
1'	165.3		
2'	113.9	5.88 (1H, d, <i>J</i> = 15.6 Hz)	5.83 (1H, d, <i>J</i> = 16.0 Hz)
3'	148.2	7.36 (1H, d, <i>J</i> = 15.6 Hz)	7.38 (1H, d, <i>J</i> = 16.0 Hz)
4'	132.3		
5'	142.4	6.06 (1H, d, <i>J</i> = 9.6 Hz)	6.09 (1H, d, <i>J</i> = 9.6 Hz)
6'	40.9	4.38 (1H, m)	4.39 (1H, m)
7'	198.3		
8'	123.8		
9'	130.6	7.84 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	7.85 (1H, d, <i>J</i> = 9.2 Hz)
10'	110.7	6.64 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	6.64 (1H, d, <i>J</i> = 9.2 Hz)
11'	153.5		
12'	110.7	6.64 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	6.64 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)
13'	130.6	7.84 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	7.84 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)
14'	12.5	1.91 (1H, d, <i>J</i> = 1.2 Hz)	1.92 (1H, d, <i>J</i> = 1.2 Hz)
15'	17.5	1.31 (1H, d, <i>J</i> = 6.6 Hz)	1.32 (1H, d, <i>J</i> = 6.8 Hz)
16'	40.0	3.05 (3H, s)	3.05 (3H, s)

^a Compound **9**: 600 MHz for ¹H and 150 MHz for ¹³C in CDCl₃.Trichostatin A (**25**), Trichostatic acid (**26**): 400 MHz for ¹H in CDCl₃.

第3節 新規 trichostatin 誘導体 **9** および trichostatin A (**25**) の活性評価

第1節にて得られた新規 trichostatin 誘導体 **9** および trichostatin A (**25**) について自然免疫応答抑制作用の評価を行った。

化合物 **9** は *Att-luc* 系のアッセイでは 0.1 ng/mL から濃度依存的に抑制作用を示した。*Dpt-lacZ* 系のアッセイでは 100 ng/mL まで抑制作用を示さなかった。S2 細胞系においては 1 ng/mL まで細胞毒性を示さなかった (Figure 31A)。よって、trichostatin 誘導体 **9** は、*Att-luc* 系において選択的に自然免疫応答抑制作用を有することが判明した (IC_{50} 2.5 nM)。一方、trichostatin A (**25**) も化合物 **9** と同様に *Att-luc* 系において選択的に自然免疫応答抑制作用を示した。そして、trichostatin A (**25**) の IC_{50} は 2.0 nM であり、活性の強さもほぼ同程度であることが判明した (Figure 31B)。

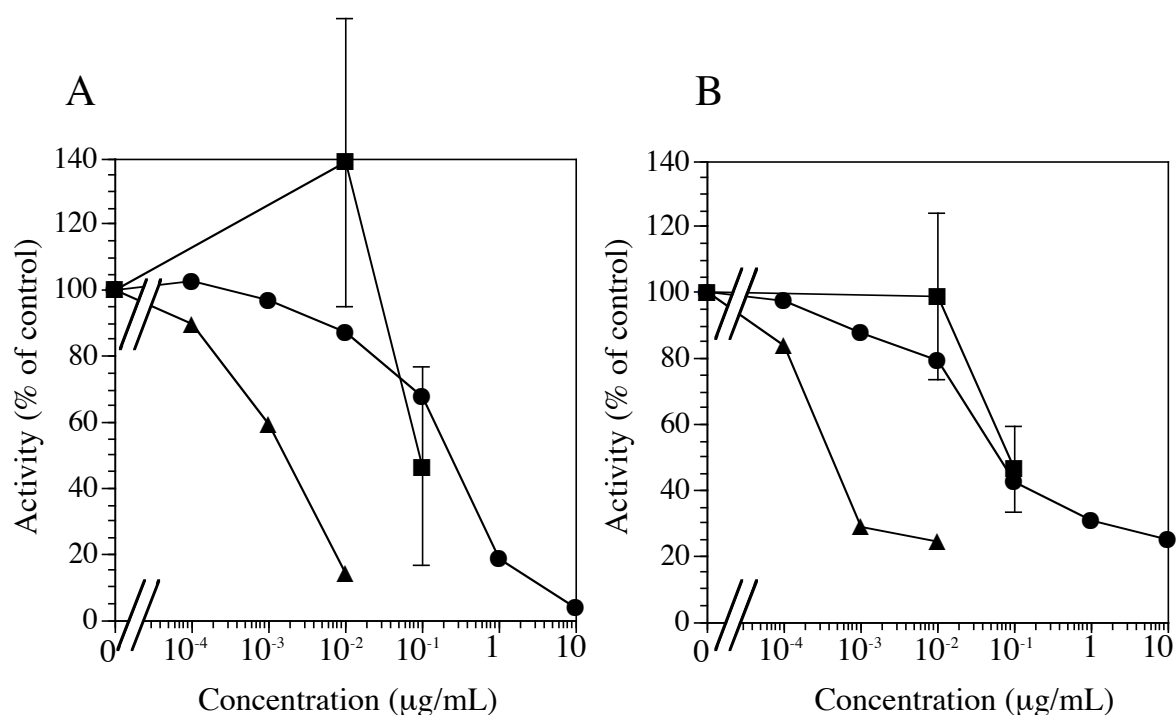


Figure 31. 放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* より得られた化合物の自然免疫応答抑制作用
(A) 化合物 **9**, (B) trichostatin A (**25**)

縦軸の値は DMSO 添加時の

Dpt-lacZ 系 (n=6) ■: 1 μg/mL の PGN を培地に添加したときの β-galactosidase/protein (ng/mg),

Att-luc 系 (n=4) ▲: 100 ng/mL の PGN を培地に添加したときの luciferase 産生量

S2 細胞系 (n=4) ●: 生細胞数 (Abs. OD450 (4h - 0h)),

の平均値を 100 とし、横軸の試料の濃度に対する相対値で表した。各試料は DMSO に溶解させて培地に添加した。

ここで化合物 **9** および trichostatin A (**25**) はいずれも *Att-luc* 系でのみ自然免疫応答選択的抑制作用を有しており、その活性の強さも同程度である。また化合物 **9** はその構造中に trichostatin A (**25**) を含んでいる。このことから、化合物 **9** はアッセイ中に分解し、trichostatin A (**25**) を生じて自然免疫応答抑制作用を示しているということが示唆された。そこで、*Att-luc* 系のアッセイの条件下で化合物を培地に添加し、細胞を培養した後に培養液を回収し、得られた試料を逆相 HPLC により分析することで化合物 **9** が分解しているか評価することにした。

まず、化合物 **9** について分析を行った結果、28 min にピークが観測された (Figure 32A)。同様に、trichostatin A (**25**)、および trichostatic acid (**26**) についてもそれぞれ分析を行い、さらにこれら 3 種の化合物を合わせて分析を行ってもそれぞれのピークが分離して観測されることが判明した (Figure 32B)。次に、化合物 **9** を 3 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で培地に添加し、回収した培養液を *n*-BuOH で抽出した。得られた抽出物は MeOH に溶かしてろ過した後、ODS カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。精製した試料について分析を行った結果、化合物 **9** 以外に trichostatin A (**25**)、および trichostatic acid (**26**) によるものであると思われるピークが観測された (Figure 32C)。さらに、観測されたピークがそれぞれ化合物 **9**、trichostatin A (**25**)、trichostatic acid (**26**) によるものであるか確認するため、精製した試料とこれら 3 種の化合物を合わせて分析を行った。その結果、Figure 32C で観測されたピークはそれぞれの化合物のピークと一致した (Figure 32D)。以上の結果から、化合物 **9** は *Att-luc* 系のアッセイの条件下で分解し、trichostatin A (**25**)、および trichostatic acid (**26**) を生じていることが判明した。このことから化合物 **9** の自然免疫応答抑制作用は分解により生じた trichostatin A (**25**) による作用であると考えられる。

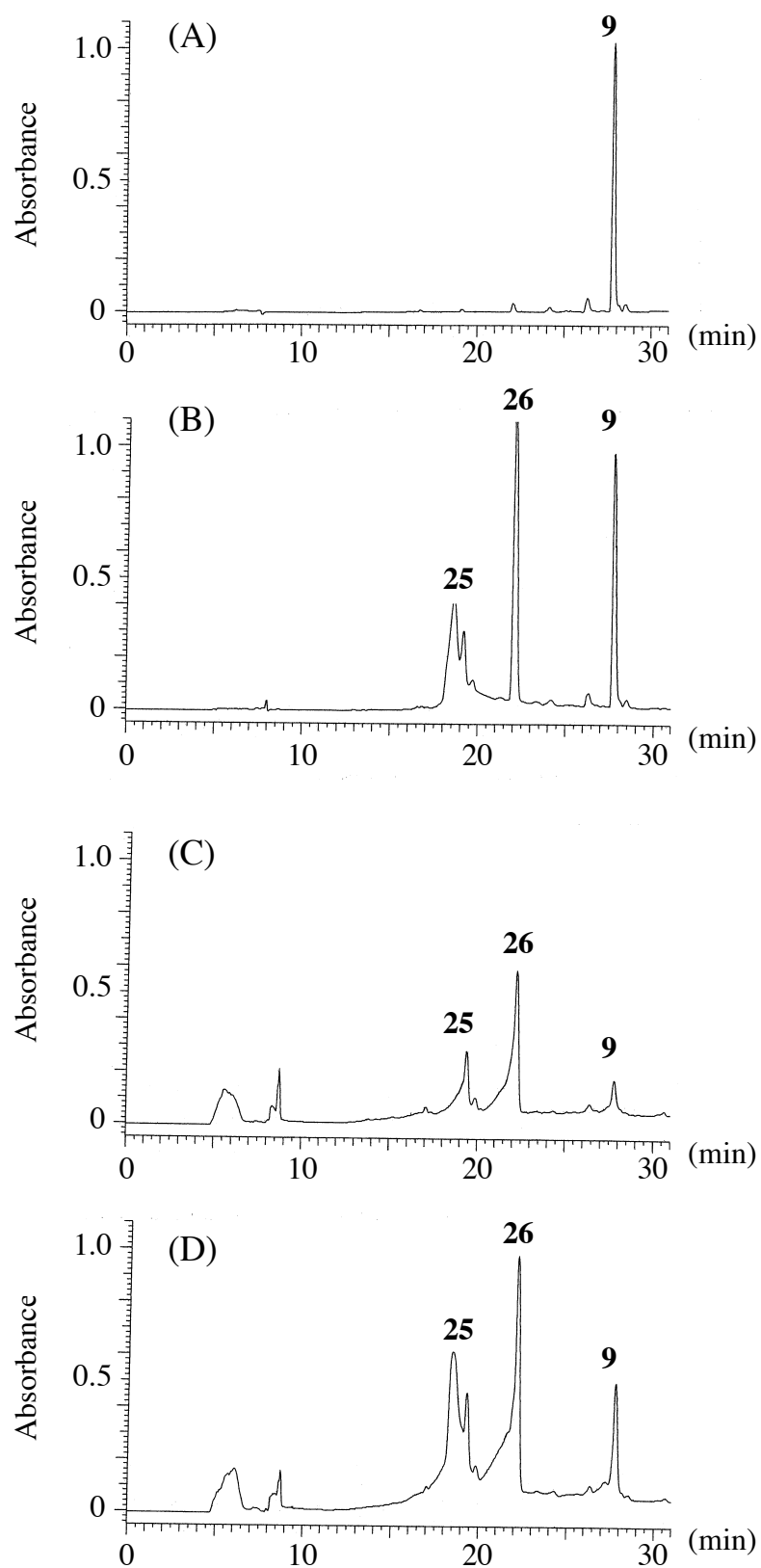


Figure 32. 逆相 HPLC クロマトグラム

(A) 化合物 **9**

(B) 化合物 **9**, trichostatin A (**25**), trichostatic acid (**26**)

(C) 精製した試料

(D) 精製した試料 + 化合物 **9**, trichostatin A (**25**), trichostatic acid (**26**)

第4節 考察

本章では、放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* の *n*-BuOH 抽出物から *Att-luc* 系のアッセイにおいて自然免疫応答抑制作用を示す新規 trichostatin 誘導体 **9** および trichostatin A (**25**) を単離した。さらに化合物 **9** は *Att-luc* 系のアッセイ中に分解し、trichostatin A (**25**) および trichostatic acid (**26**) を生じることを明らかにし、このことから化合物 **9** の自然免疫応答抑制作用は trichostatin A (**25**) によるものであるということが示唆された。

Trichostatin A (**25**) は 1976 年に放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* より単離された化合物であり、²² クラス I およびクラス II のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害作用を有している。²³ HDAC はヒストンを脱アセチル化することにより遺伝子の転写を負に制御する酵素であり、HDAC 阻害剤により酵素活性が阻害されると、その制御下にある遺伝子の過剰発現が生じる。^{24,25} 本研究に用いた *Att-luc* 系はショウジョウバエの自然免疫活性化経路のうち imd 経路に対する自然免疫応答作用の評価系であるため、化合物の HDAC 阻害作用により過剰発現した何らかの因子が imd 経路の抑制を引き起こすことで、自然免疫応答を抑制した可能性がある。

しかし、化合物 **9** および trichostatin A (**25**) は *Att-luc* 系では抑制作用を示したものの、*Dpt-lacZ* 系ではいずれも抑制作用を示さなかった。このような結果が得られたのは、細胞と個体の間で、化合物の吸収、分布などの過程が異なることに起因すると考えられる。また、*Att-luc* 系で用いた S2 細胞は血球細胞としての特徴を持つのに対し、ショウジョウバエ個体では主に脂肪体で免疫反応を行うため、S2 細胞と脂肪体との間で機能やシグナル伝達経路が異なるため、異なる結果が得られたと考えられる。

また、当研究室ではこれまでも HDAC 阻害物質である diheteropeptin (**27**)²⁶ および TAN-1746 (**28**)²⁷ を単離し、これらの化合物が自然免疫応答抑制作用を有することを見出している。²⁸ (Figure 33) 近年の研究で、HDAC 阻害物質がヒトの自然免疫活性化機構である TLR 経路に対する自然免疫応答抑制作用を有することが明らかになっているが、その作用機序はまだ未解明な点が多い。²⁹ したがって、今後、これらの化合物の作用機序についてさらなる検討を行う必要がある。

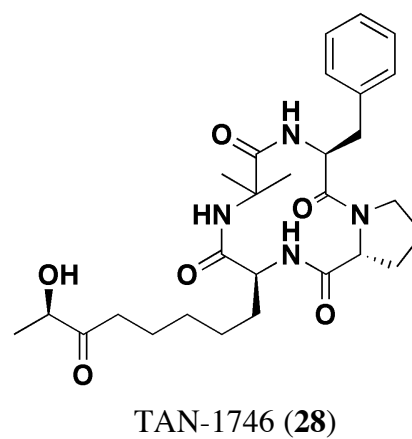
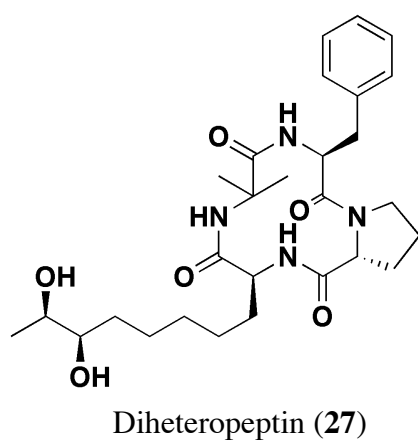


Figure 33. 過去に当研究室で単離された HDAC 阻害作用を有する自然免疫応答抑制物質

第 3 章

放線菌 *Streptomyces* sp. に含まれる転写・翻訳抑制物質の探索

序論で述べたようにスクリーニングにおいて、1 種の微生物抽出物に転写・翻訳抑制作用を見出した。その微生物抽出物からは新規化合物 **10** を転写阻害物質として単離した。本章では、化合物 **10** の単離・構造決定及び生物活性評価について述べる。

第 1 節 *Streptomyces* sp. に含まれる転写阻害物質 **10** の単離

放線菌 *Streptomyces* sp. EtOH 抽出物について活性試験を行ったところ、*Dpt-lacZ* 系及び *hs-lacZ* 系ではいずれも、10 µg/mL で活性を 40% 程度まで抑制し、またその濃度では S2 細胞系において細胞毒性を示さなかった。したがって、この抽出物は自然免疫応答抑制作用ではなく、転写または翻訳抑制作用を有すると判断し、活性成分の分画を行った (Figure 34)。分画は *Dpt-lacZ* 系にて抑制作用を示した画分について、S2 細胞系で毒性の有無を確認しながら行った。

EtOH 抽出物 21.68 g を Figure 34 に示すように分配し、*n*-BuOH 可溶画分 4.13 g と H₂O 可溶画分 18.24 g を得た。それぞれの画分について *Dpt-lacZ* 系のアッセイを行ったところ、*n*-BuOH 可溶画分は 1 µg/mL で 85% 程度の抑制を示し、またその濃度では S2 細胞系において細胞毒性を示さなかった。一方、H₂O 可溶画分は 1 µg/mL において抑制作用を示さなかった。したがって、*n*-BuOH 可溶画分に転写・翻訳阻害物質が含まれていると考え、カラムクロマトグラフィーによる分画を行い、6 フラクシオンを得た。得られたフラクションについて、活性試験を行ったところ、Fr.5 に最も強く活性が検出された。その後、*Dpt-lacZ* 系における活性を指標としてさらに種々のカラムクロマトグラフィーにより分画した (Figure 35)。その結果、化合物 **10** を転写・翻訳抑制物質として単離した。

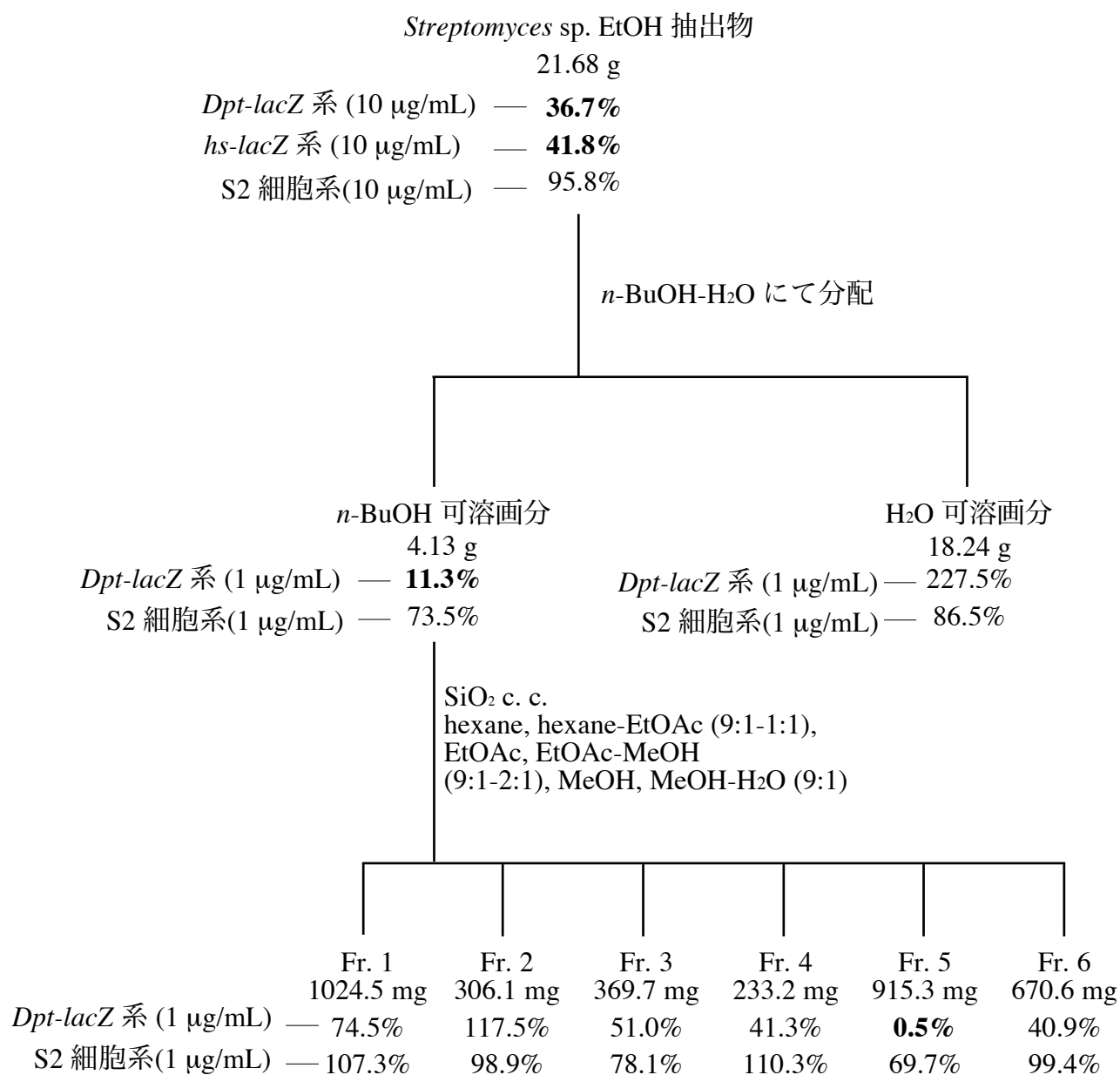


Figure 34. *Streptomyces* sp. EtOH 抽出物の分画 (1)

重量の下にコントロールに対する活性を示した

Dpt-lacZ 系および *hs-lacZ* 系: β-galactosidase 産生量, S2 細胞系: 細胞生存率

なお, *Dpt-lacZ* 系および *hs-lacZ* 系で選択的に抑制作用を示したフラクションの活性の値を太字で示した

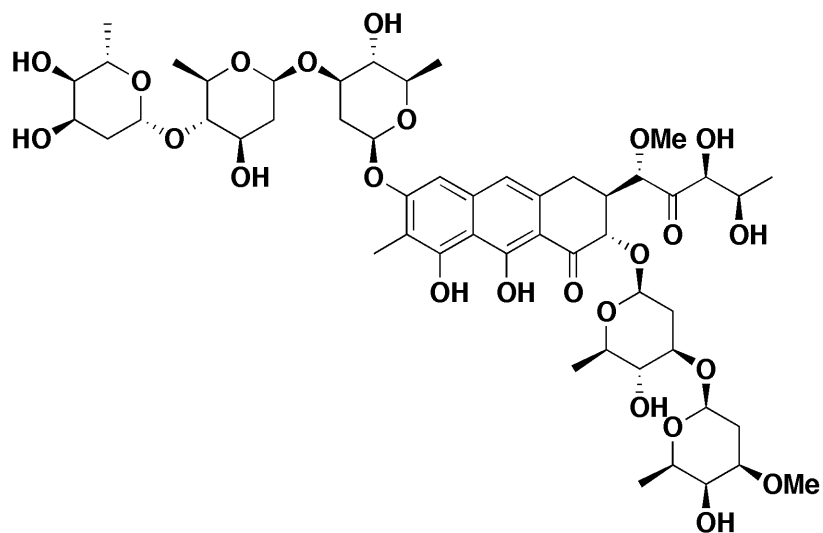
Fr. 5
915.3 mg

SiO₂ c. c.
CHCl₃, CHCl₃-MeOH
(99:1-1:1), MeOH

ろ過 (CHCl₃)
CHCl₃ 不溶画分

ODS c. c.
H₂O-MeOH (7:3-1:9),
MeOH

GPC HPLC
(GS 310 ; MeOH)



10

Figure 35. *Streptomyces* sp. EtOH 抽出物の分画 (2)

第2節 化合物 **10** の構造解析

第1項 平面構造の解析

化合物 **10** は黄色の不定形固体として得られ、HRFABMS において m/z 1083.4637 [M-H]⁻ にピークが観測され、分子式 C₅₂H₇₆O₂₄ と判明した。また、¹H NMR, ¹³C NMR, HMQC スペクトルより、2 個のカルボニル炭素 (d 213.6, 197.6), 8 個の 4 級 sp² 炭素 (d 177.2, 162.0, 160.7, 140.4, 139.5, 113.3, 111.7, 108.4), 2 個の sp² メチン炭素 (d 112.9, 100.7), 5 個のアセタール炭素 (d 101.7, 101.2, 100.1, 99.5, 99.4), 19 個のオキシメチン炭素 (d 84.4, 83.4, 81.2, 80.0, 79.4, 79.3, 78.3, 78.1, 76.8, 76.3, 74.5, 73.6, 73.4, 72.7, 72.0, 71.4, 71.1, 69.3, 69.1), 1 個のメチン炭素 (d 43.7), 2 個のメトキシ炭素 (d 59.6, 58.4), 6 個のメチレン炭素 (d 40.6, 38.3, 38.0, 36.0, 33.4, 29.3), 7 個のメチル炭素 (d 19.7, 19.2, 18.9, 18.4, 18.1, 16.9, 8.1) の存在が判明した (Table 3).

平面構造決定のために ¹H-¹H COSY および HOHAHA スペクトルを測定した結果、以下に示した部分構造 A~G が明らかになった (Figure 36).

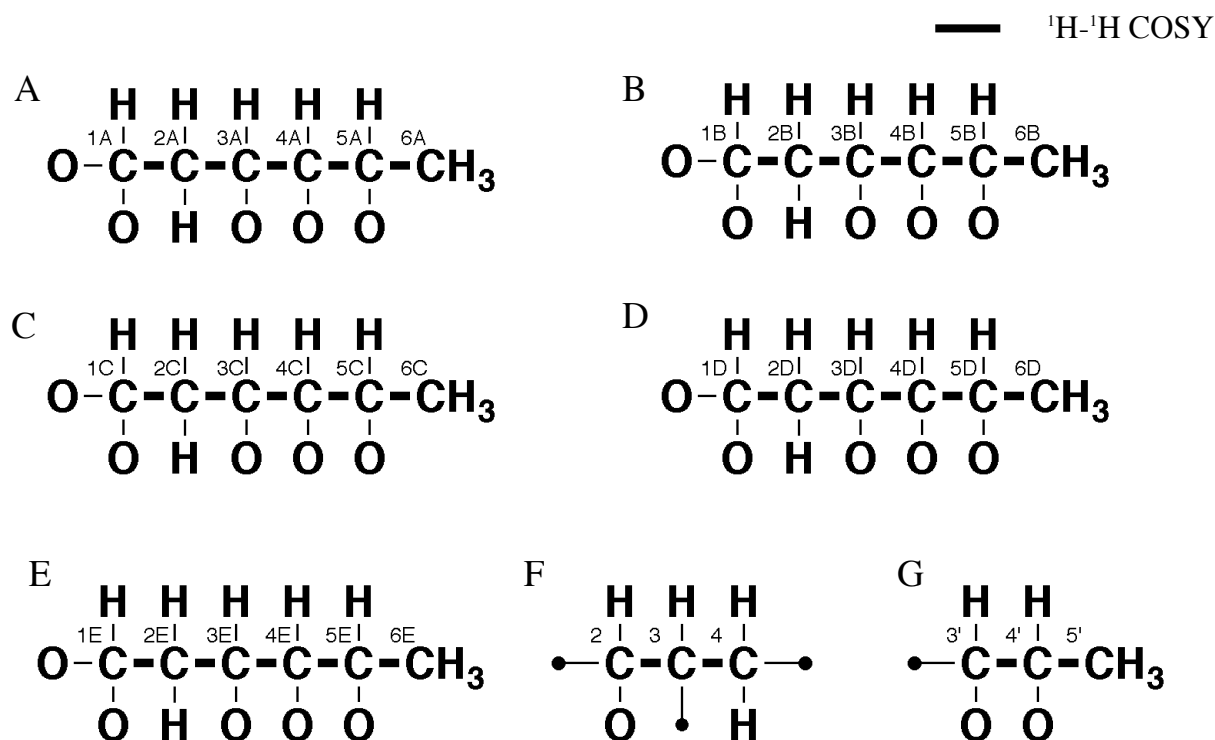


Figure 36. 化合物 **10** の部分構造 (1)

続いて HMBC スペクトルにより，5C 位水素から 1C 位炭素へ，1C 位水素から 4B 位炭素へ，5B 位水素から 1B 位炭素へ，1B 位水素から 3A 位炭素へ，5A 位水素から 1A 位炭素へ相関が観測され，部分構造 A, B, C の結合が確認された。また，7E 位水素から 3E 位炭素へ，5E 位水素から 1E 位炭素へ，1E 位水素から 3D 位炭素へ，5D 位水素から 1D 位炭素へ，1D 位水素から 2 位炭素へ，1' 位水素から 2 位，3 位，4 位，2' 位炭素へ，6' 位水素から 1' 位炭素へ，3' 位水素から 2' 位炭素へ相関が観測され，部分構造 D, E, F, G の結合が確認された (Figure 37)。

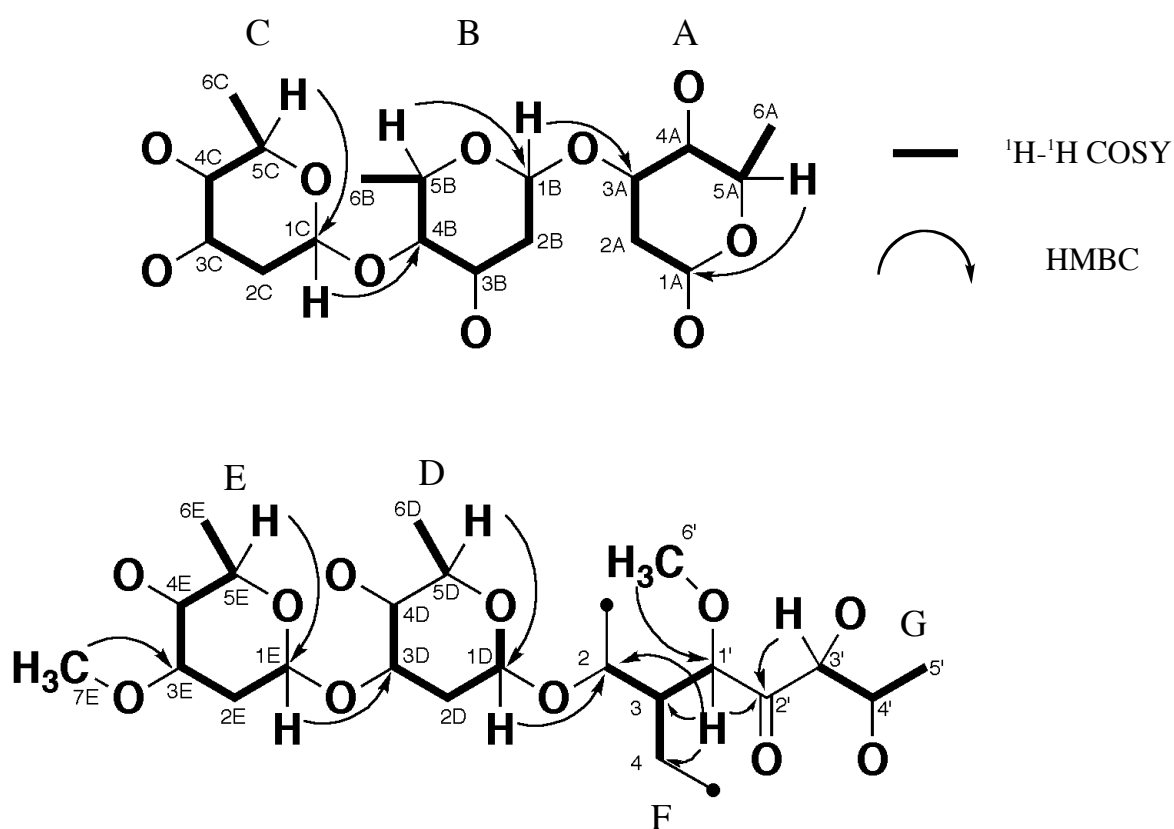


Figure 37. 化合物 **10** の部分構造 (2)

さらに，HMBC スペクトルにより，1A 位水素から 6 位炭素へ，5 位水素から 6 位，7 位，9 位，8a 位炭素へ，11 位水素から 7 位，8 位炭素へ，10 位水素から 1 位，5 位，8 位，8a 位，9a 位，10a 位炭素へ，4 位水素から 4a 位炭素へ相関が観測され，以下の平面構造が判明した (Figure 38)．この平面構造において化合物 **10** のアグリコン部は *Streptomyces plicatus* より単離された mithramycin (**29**) と一致していた.³⁰

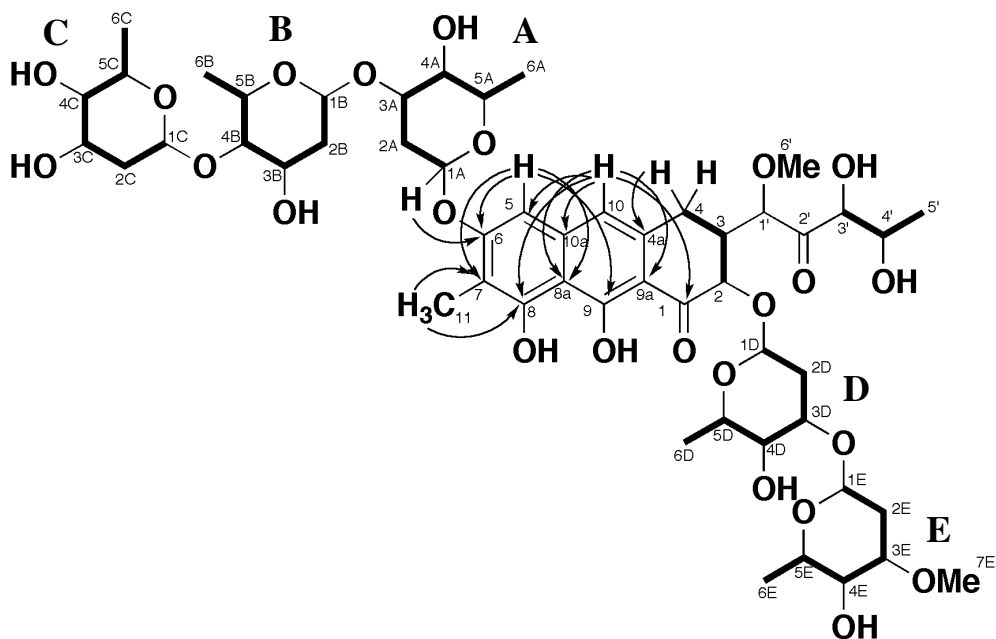


Figure 38. 化合物 **10** の平面構造

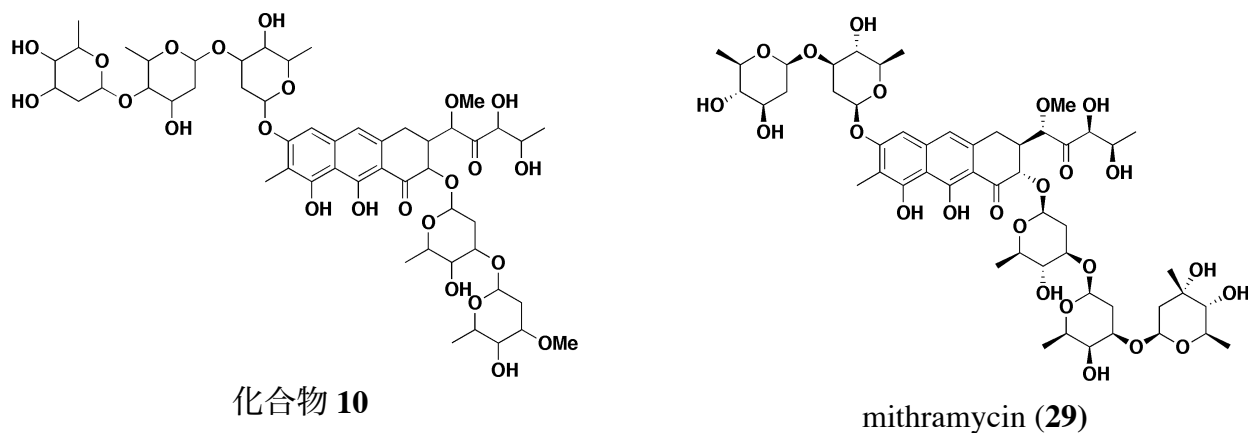


Figure 39. 化合物 **10** および mithramycin (**29**) の構造

Table 3. 化合物 **10** の NMR データ

Position	¹³ C (ppm) ^a	¹ H (ppm) ^a
1	197.6	
2	78.3	4.35 (1H, d, <i>J</i> =12 Hz)
3	43.7	2.64 (1H, m)
4	29.3	2.92 (1H, dd, <i>J</i> =12.6, 5.4 Hz) 2.51 (1H, dd, <i>J</i> =12.6, 4.2 Hz)
5	100.7	6.50 (1H, s)
6	160.7	
7	108.4	
8	162.0	
9	177.2	
10	112.9	6.34 (1H, s)
11	8.1	2.05 (3H, s)
4a	139.5	
8a	111.7	
9a	111.7	
10a	140.4	
1'	83.4	4.64 (1H, d, <i>J</i> =6.6 Hz)
2'	213.6	
3'	80.0	4.06 (1H, d, <i>J</i> =2.4 Hz)
4'	69.1	4.12 (1H, dq, <i>J</i> =6.6, 2.4 Hz)
5'	19.7	1.1-1.2 (3H, m)
6'	59.6	3.31 (3H, s)
1A	99.5	5.13 (1H, d, <i>J</i> =9.6 Hz)
2A	38.0	2.31-2.36 (1H, m) 2.05-2.15 (1H, m)
3A	81.2	3.64-3.70 (1H, m)
4A	76.8	3.04 (1H, dd, <i>J</i> =9.0, 9.0 Hz)
5A	73.4	3.40-3.50 (1H, m)
6A	18.9	1.29 (3H, d, <i>J</i> =6.0 Hz)
1B	100.1	4.62 (1H, d, <i>J</i> =9.6 Hz)
2B	40.6	2.05-2.15 (1H, m) 1.40-1.52 (1H, m)
3B	72.0	3.40-3.50 (1H, m)
4B	78.1	2.86 (1H, dd, <i>J</i> =9.0, 9.0 Hz)
5B	73.6	3.25 (1H, dq, <i>J</i> =9.0, 7.2 Hz)
6B	29.3	1.1-1.2 (3H, d, <i>J</i> =7.2 Hz)

Table 3. 化合物 **10** の NMR データ (つづき)

Position	¹³ C (ppm) ^a	¹ H (ppm) ^a
1C	99.4	5.05 (1H, dd, <i>J</i> =9.6, 1.8 Hz)
2C	36.0	2.12 (1H, d, <i>J</i> =13.2 Hz) 1.51 (1H, dd, <i>J</i> =13.2, 9.6 Hz)
3C	79.3	3.54 (1H, br. s)
4C	74.5	3.11 (1H, dd, <i>J</i> =9.6, 2.4 Hz)
5C	71.4	3.79 (1H, dq, <i>J</i> =9.6, 6.6 Hz)
6C	18.9	1.28 (3H, <i>J</i> =6.6 Hz)
1D	101.7	4.58 (1H, dd, <i>J</i> =9.6, 2.4 Hz)
2D	38.3	2.06-2.16 (1H, m) 1.1-1.3 (1H, m)
3D	84.4	1.90-1.96 (1H, m)
4D	76.8	2.61 (1H, dd, <i>J</i> =9.0, 8.4 Hz)
5D	72.7	2.75 (1H, dq, <i>J</i> =9.0, 6.0 Hz)
6D	18.3	1.1-1.3 (3H, d, <i>J</i> =6.0 Hz)
1E	101.2	2.78 (1H, dd, <i>J</i> =10.8, 2.4 Hz)
2E	33.4	1.34 (1H, dd, <i>J</i> =12.0, 10.8 Hz) 1.10 (1H, dd, <i>J</i> =12.0 Hz)
3E	79.4	3.56 (1H, br. s)
4E	69.3	2.61 (1H, d, <i>J</i> =2.4 Hz)
5E	71.1	2.75 (1H, dq, <i>J</i> =6.6, 2.4 Hz)
6E	16.91	1-1.3 (3H, d, <i>J</i> =6.6 Hz)
7E	58.4	3.43 (3H, s)

^a 600 MHz for ¹H and 150 MHz for ¹³C in CD₃OD

第2項 相対構造の解析

前項の平面構造の解析から化合物 **10** は 5 個の 2,6-dideoxy hexose を有していることが明らかになった。まず、糖 A は 1A 位水素と 2A 位水素間のカップリング定数が 9.6 Hz であることから、1A 位水素がアキシアルに配置していることが明らかとなった。続いて、3A 位水素と 4A 位水素間および 4A 位水素と 5A 位水素間のカップリング定数がいずれも 9.0 Hz であることから、3A 位、4A 位および 5A 位水素はいずれもアキシアルに配置していることが判明した。また、ROESY スペクトルを測定したところ、1A 位水素と 3A 位水素、3A 位水素と 5A 位水素、5A 位水素と 1A 位水素間で相関が確認された。これらの結果から糖 A は olivose と判明した (Figure 40)。

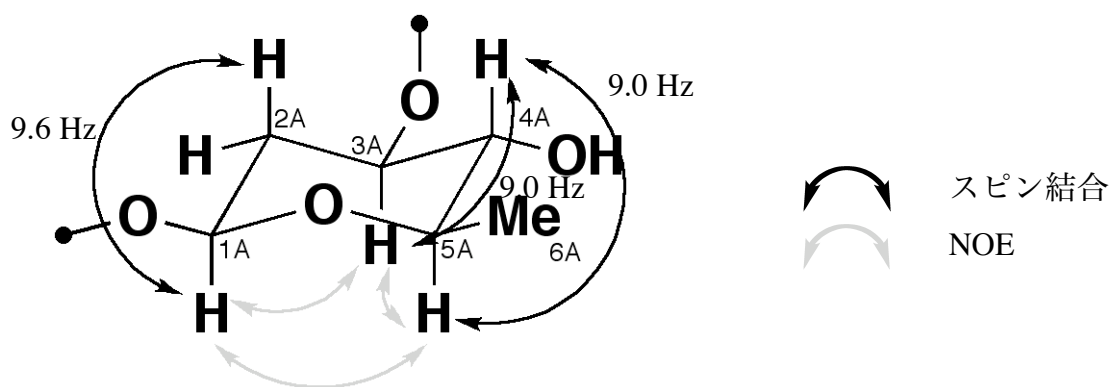


Figure 40. 糖 A の相対構造解析

また、糖 B は 1B 位水素と 2B 位水素間のカップリング定数が 9.6 Hz であることから、1B 位水素がアキシアルに配置していることが明らかとなった。続いて、3B 位水素と 4B 位水素間および 4B 位水素と 5B 位水素間のカップリング定数がいずれも 9.0 Hz であることから、3B 位、4B 位および 5B 位水素はいずれもアキシアルに配置していることが判明した。また、ROESY スペクトルを測定したところ、1B 位水素と 3B 位水素、3B 位水素と 5B 位水素、5B 位水素と 1B 位水素間で相関が確認された。これらの結果から糖 B は olivose と判明した (Figure 41)。

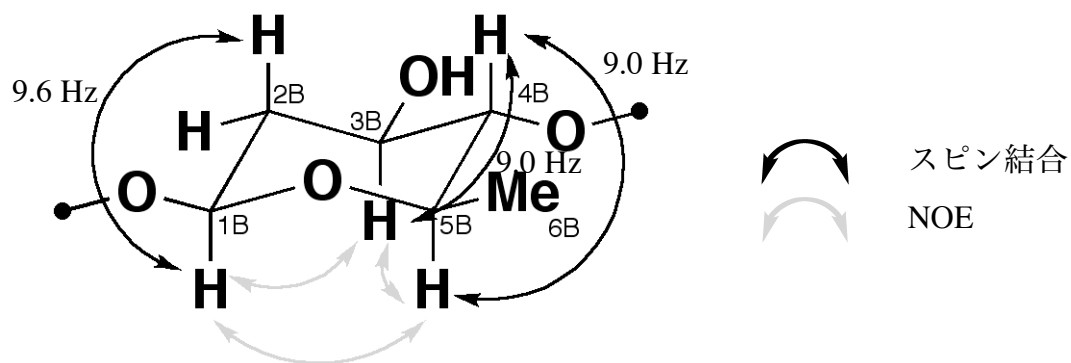


Figure 41. 糖 B の相対構造解析

また、糖 C は 1C 位水素と 2つの 2C 位水素間のカップリング定数がそれぞれ 9.6 Hz および 1.8 Hz であることから、1C 位水素がアキシアルに配置していることが明らかとなった。続いて、3C 位水素と 4C 位水素間のカップリング定数が 2.4 Hz であり、4C 位水素と 5C 位水素間のカップリング定数が 9.6 Hz であることから、3C 位水素はエクアトリアルに、4C 位および 5C 位水素はいずれもアキシアルに配置していることが判明した。また、ROESY スペクトルを測定したところ、1C 位水素と 5C 位水素間で相関が確認された。これらの結果から糖 C は digitoxose と判明した (Figure 42)。

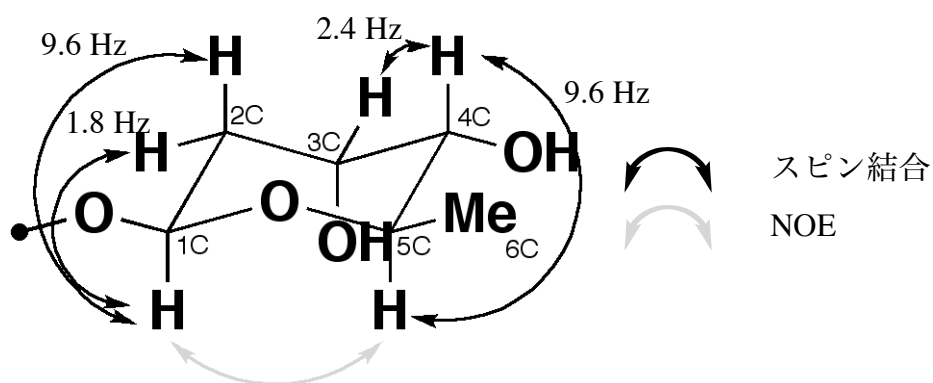


Figure 42. 糖 C の相対構造解析

また、糖 D は 1D 位水素と 2 つの 2D 位水素間のカップリング定数がそれぞれ 9.6 Hz および 2.4 Hz であることから、1D 位水素がアキシアルに配置していることが明らかとなった。続いて、3D 位水素と 4D 位水素間のカップリング定数が 8.4 Hz であり、4D 位水素と 5D 位水素間のカップリング定数が 9.0 Hz であることから、3D 位、4D 位および 5D 位水素はいずれもアキシアルに配置していることが判明した。また、ROESY スペクトルを測定したところ、1D 位水素と 3D 位水素、3D 位水素と 5D 位水素、5D 位水素と 1D 位水素間で相関が確認された。これらの結果から糖 D は *olivose* と判明した (Figure 43)。

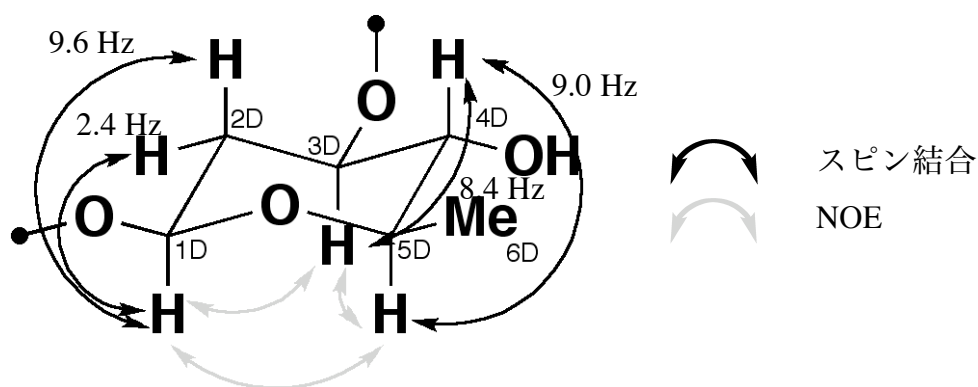


Figure 43. 糖 D の相対構造解析

また、糖 E は 1E 位水素と 2 つの 2E 位水素間のカップリング定数がそれぞれ 8.4 Hz および 2.4 Hz であることから、1E 位水素がアキシアルに配置していることが明らかとなった。続いて、4E 位水素と 5E 位水素間のカップリング定数が 2.4 Hz であり、さらに ROESY スペクトルを測定したところ、1E 位水素と 3E 位水素、3E 位水素と 5E 位水素、5E 位水素と 1E 位水素間で相関が確認された。このことから 3E 位水素および 5E 位水素はアキシアルに、4E 位水素はエクアトリアル位に配置していることが判明した。これらの結果から糖 E は 3-*O*-methyl-oliose と判明した (Figure 44)。

ここで化合物 **10** のアグリコン部分の ^1H NMR および ^{13}C NMR の値を、mitharamycin (**29**) の文献の値³⁰と比較したところ、ほぼ一致した。また、後述のように、mithramycin (**29**) およびその類縁体では、アグリコン部分の絶対構造が同一である。よって化合物 **10** の相対構造は mitharamycin (**29**) と同一であると推測される。以上のことから、化合物 **10** の相対

構造は Figure 45 のように決定した.

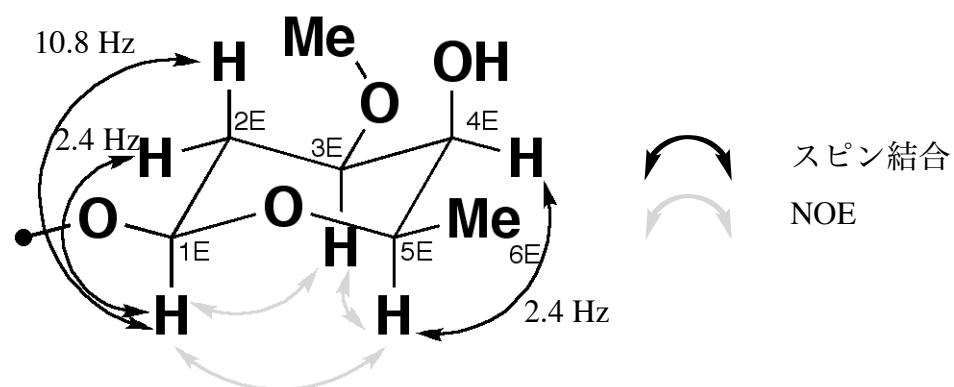


Figure 44. 糖 E の相対構造解析

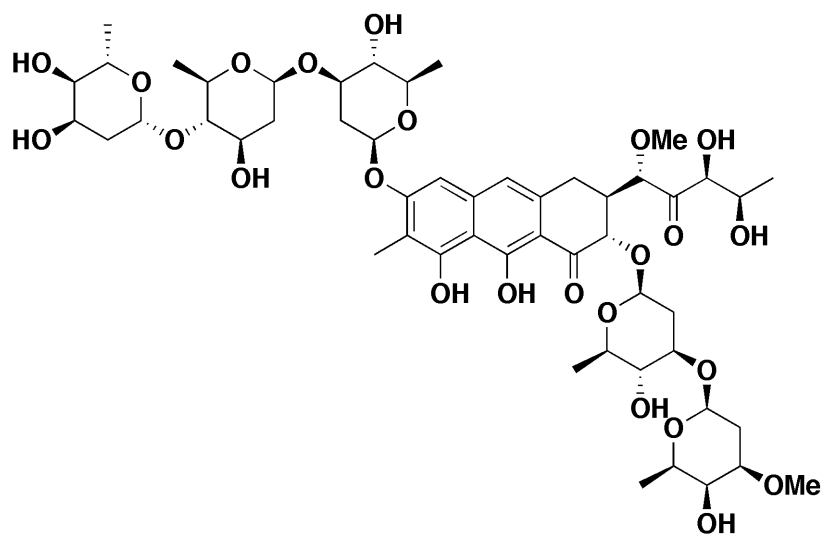


Figure 45. 化合物 **10** の相対構造

第3節 新規オーレオリン酸類化合物 **10** の活性評価

第1節にて得られた新規オーレオリン酸類化合物 **10** について転写・翻訳阻害作用の評価を行った。

化合物 **10** は *Dpt-lacZ* 系および *hs-lacZ* 系のアッセイでは 30 ng/mL から濃度依存的に抑制作用を示した。S2 細胞系においては 100 ng/mL から濃度依存的に毒性を示した (Figure 46)。 *Dpt-lacZ* 系および *hs-lacZ* 系のアッセイにおいてほぼ同程度の活性を示したことから、化合物 **10** は、自然免疫応答抑制作用ではなく転写または翻訳阻害作用を有することが判明した。

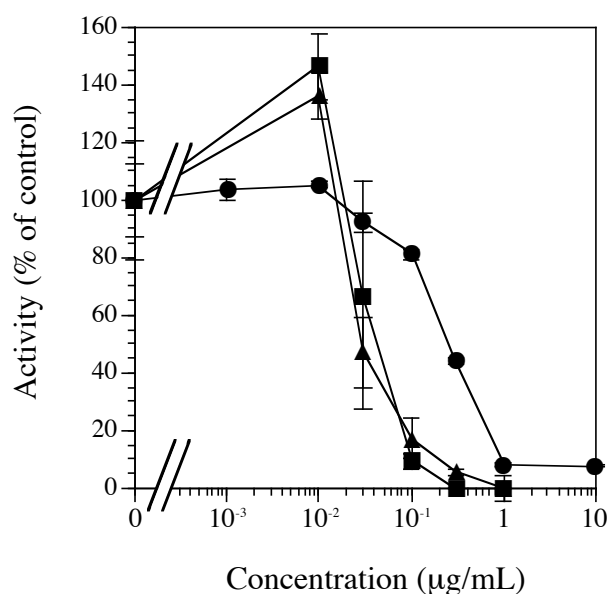


Figure 46. 放線菌 *Streptomyces* sp. より得られた化合物 **10** の自然免疫応答抑制作用

縦軸の値は DMSO 添加時の

Dpt-lacZ 系 (n=6) ■: 1 µg/mL の PGN を培地に添加したときの β-galactosidase/protein (ng/mg),

hs-lacZ 系 (n=6) ▲: 1 µg/mL の PGN を培地に添加したときの β-galactosidase/protein (ng/mg),

S2 細胞系 (n=4) ●: 生細胞数 (Abs. OD450 (4h - 0h)),

の平均値を 100 とし、横軸の試料の濃度に対する相対値で表した。各試料は DMSO に溶解させて培地に添加した。

第4節 考察

本章では、放線菌 *Streptomyces* sp. の EtOH 抽出物から転写阻害作用を有する新規化合物 **10** を単離した。

化合物 **10** は第2節で述べたように mithramycin (**29**) の類縁体である。Mithramycin (**29**) は1953年に放線菌 *Streptomyces plicatus* より初めて単離された化合物である。³¹ この化合物2分子が1個の Mg^{2+} イオンと複合体を形成し、DNAのGC塩基が豊富な領域に結合することでポリメラーゼの機能を妨げ、DNAの転写や複製を阻害することが知られている。^{32,33} 臨床においては悪性腫瘍の骨転位による高カルシウム血症、ページェット病、慢性骨髄性白血病および急性骨髄性白血病の治療に用いられてきた。³⁴ Mithramycin (**29**) の類縁体としては chromomycin A3 (**30**)³⁵ や UCH9 (**31**)³⁶ などの化合物が知られており、これらの化合物はオーレオリン酸類化合物と呼ばれている (Figure 47)。

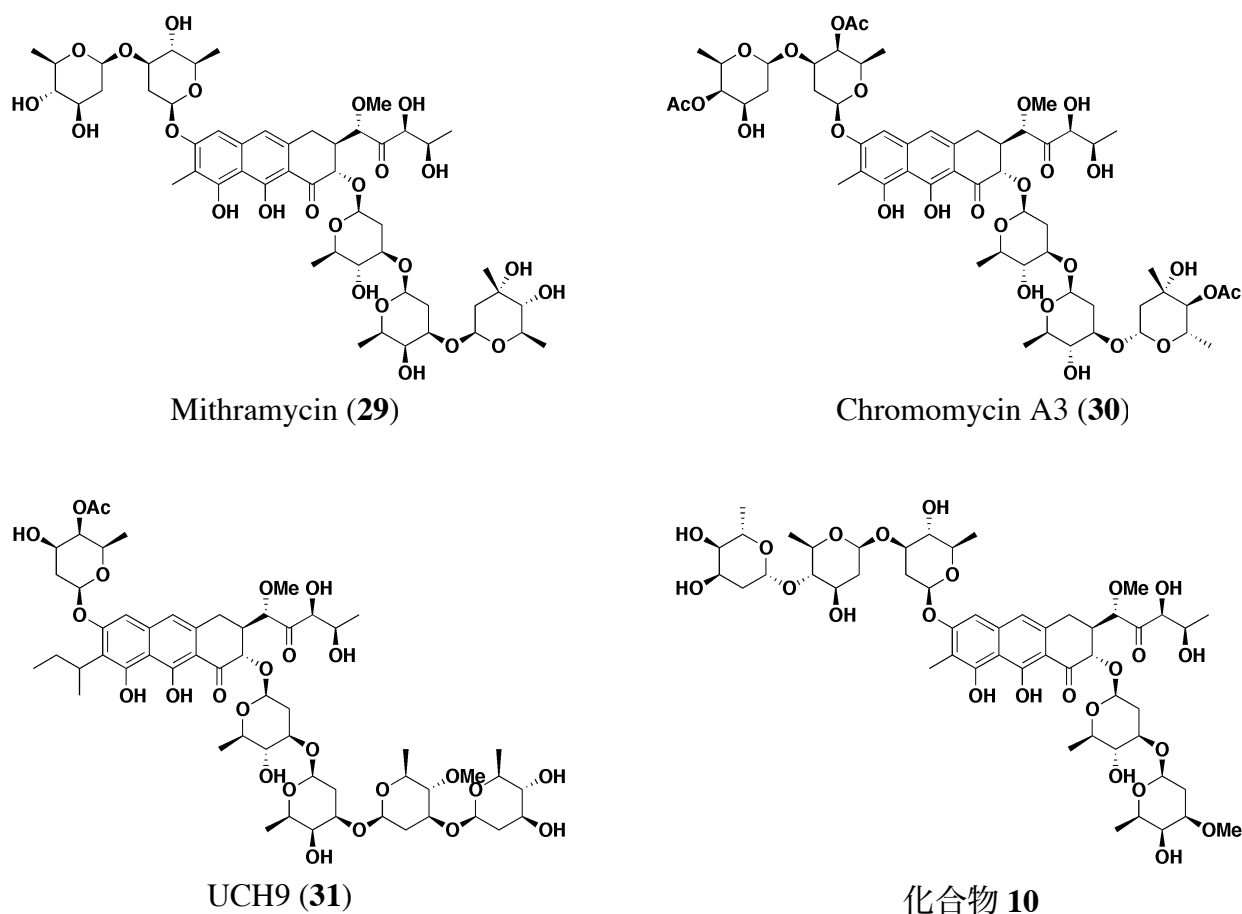


Figure 47. オーレオリン酸類化合物

Figure 47 に示すように、オーレオリン酸類の化合物ではアグリコン部の 2 位および 6 位に糖が結合している。これまでにオーレオリン酸類の化合物では 6 位に単糖，または二糖が結合している化合物しか得られておらず，よって，化合物 **10** のように 6 位に三糖が結合している化合物は初めての報告例となる。

また，天然物のオーレオリン酸類では糖の種類も限られており，D-olivose, D-oliose, D-mycarose, および L-chromose B またはこれらの糖の *O*-メチル化，または *O*-アセチル化誘導体しか得られていない。これまでに，上記の 4 種以外の 2, 6-dideoxy sugar の生合成遺伝子がコードされたプラスミドを，オーレオリン酸を生産する菌に導入することで，新たなオーレオリン酸類化合物を得るという試みがなされているが，^{37,38} 天然物として digitoxose を有するオーレオリン酸類が得られたのは今回が初めてである。

また，これまでに得られたオーレオリン酸類の化合物ではいずれも 1, 3 グリコシド結合により糖同士が結合していたが，化合物 **10** では糖 C と糖 B が 1, 4 グリコシド結合しており，このことも天然物としてのオーレオリン酸では初めてである。

以上のように，化合物 **10** は様々な点で既知類縁体と異なっており，したがって生物活性についても感受性や選択性に違いが生じると考えられる。今後，化合物 **10** についてさらなる生物活性評価を行う必要がある。化合物 **10** の絶対構造については，天然物に対して加水分解を行い，アグリコン部やそれぞれの糖の比旋光度を標品と比較することにより決定する方針である。

結語

自然免疫は、全ての多細胞生物が普遍的に有する生体防御機構であり、広範囲の異物を速やかに生体から排除する一次防御反応としてはたらいっている。ヒトにおいては日和見感染症や敗血症に関与することが知られているが、これまでのところ、これらの疾患に対して自然免疫制御に基づく治療薬は上市されていない。また、自然免疫は近年になってようやく注目され始めた免疫機構であるため、活性化機構について未解明な点が多い。したがって、新規医薬品の開発や自然免疫の活性化機構を明らかにするためには、自然免疫を選択的に制御する化合物が必要である。そこで、本研究では、自然免疫制御物質の探索のため、天然資源を対象としてショウジョウバエを用いたアッセイ系によりスクリーニングを行った。その結果、2種の微生物抽出物に自然免疫選択的な抑制作用を見出し、さらに1種の微生物抽出物に転写・翻訳抑制作用を見出したので、それぞれ分画を行った。

糸状菌 *Aspergillus* sp. *n*-BuOH 抽出物からは新規デプシペプチド **8** を自然免疫応答抑制物質として単離・同定した。化合物 **8** はショウジョウバエには自然免疫選択的な抑制作用を示したが、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に対してはほとんど影響を及ぼさなかった。また、化合物 **8** と同一の平面構造を有する既知の環状デプシペプチド aspergillicin E (**11**) を合成し、活性評価を行ったが、ほとんど抑制作用を示さなかった。

放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* *n*-BuOH 抽出物からは新規 trichostatin 誘導体 (**9**) を自然免疫応答抑制物質として単離・同定した。さらに化合物 **9** は *Att-luc* 系のアッセイ条件下で分解し、trichostatin A (**25**) および trichostatic acid (**26**) を生じることを明らかにした。

放線菌 *Streptomyces* sp. EtOH 抽出物からは、自然免疫応答抑制作用ではなく転写阻害作用を有する新規オーレオリン酸類化合物 **10** を単離・同定した。化合物 **10** は構成糖の種類および糖の結合位置が既知のオーレオリン酸類化合物とは異なるため、生物活性についても感受性や選択性の違いが生じると考えられる。

自然免疫は現在、精力的に研究が行われている分野であり、今後ますますの発展が予想される。本研究の内容が、自然免疫活性化機構の解明や自然免疫制御に基づく新規医薬品の開発へ向けて、価値ある一端を担うことを期待する。

実験の部

マススペクトルは日本電子 JEOL JMS-DX 303 型質量分析計, JMS-700 型質量分析計および JMS-T 100 GC 型質量分析計を用いて測定した. NMR スペクトルは, 日本電子 JEOL JNM ECA-600 型核磁気共鳴装置および JEOL JNM AL-400 型核磁気共鳴装置を用いて測定し, 内部標準物質として TMS を使用した. 化学シフト値は ppm で表し, 結合様式は, 一重線 : s, 二重線 : d, 三重線 : t, 四重線 : q, 二分分裂した二重線 : dd, 二分分裂した三重線 : dt, 二分分裂した四重線 : dq, 多重線 : m, 幅広いシグナル : br. で表した. カラムクロマトグラフィーには Silica gel 60 (70-230 mesh ASTM, Merck), Cosmosil 140C₁₈-OPN (ナカライテスク) を用いた. カラムクロマトグラフィーの移動相には担体 1 g に対して 2 mL の溶媒を 1 fraction として用い, 試料を順次溶出させた. HPLC は LC-908W (日本分析工業), LC-9201 (日本分析工業) および D7000 (日立) を用い, それらのカラムとして, JAIGEL-GS310 (φ 20 mm x 600 mm) (日本分析工業), JAIGEL-1H (φ 21.5 mm x 500 mm) (日本分析工業) および Mightysil RP-18 GP (φ 4.6 mm x 250 mm) (関東化学) をそれぞれ用いた. TLC は TLC aluminium sheets Silica gel 60F₂₅₄ (0.25mm, Merck), TLC aluminium sheets RP-18 F_{254S} (0.25mm, Merck) を用い, 検出は UV (254, 365 nm) 照射下における蛍光およびアニスアルデヒド硫酸溶液またはリンモリブデン酸溶液噴霧後の加熱発色により行った. 試薬は, 市販のものを精製せずにそのまま用いた.

自然免疫応答制御物質の検出系 (*Dpt-lacZ* 系)

化合物の自然免疫活性に対する作用は、ショウジョウバエの抗菌ペプチド *dipteracin* 遺伝のプロモーター活性を測定することによって行った. *dipteracin* プロモーター下流に *lacZ* 遺伝子を持ったショウジョウバエ (*Dpt-lacZ*) の 3 齢雌幼虫を, 70% ethanol で滅菌後, クリーンベンチ内で解剖し, 抗菌ペプチドの産生器官である脂肪体を露出させた. 解剖した幼虫は 96-well plate の各 well に 1 匹ずつ入れて 25 °C で 12 時間培養した. 培養には 20% FBS, 1% 抗生物質 (Antibiotics-Antimycotic (GIBCO)) を含む Schneider's Drosophila medium

(SDM) (GIBCO) を用い、自然免疫を活性化するために DAP 型ペプチドグリカン (DAP-PGN) (Invivogen) を培養液中に最終濃度 100 ng/mL となるように加え、試料は培地に最終濃度 0.5% (v/v) となるように添加した。

12 時間培養した後、幼虫を 200 μ L reaction buffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , pH 7.8) 中で、超音波破碎機 (ULTRASONIC PROCESSOR XL : MISONIX) を用いて破碎した。続いて遠心分離 (9170 x g, 10 min., 4 °C MX-300 : TOMY) し、上清 100 μ L を回収して、 β -galactosidase 活性測定用の試料とした。

20 μ L の β -Galactosidase 測定試料に reaction buffer で 80 倍に希釈した Galacton plus (TROPIX) を 80 μ L 添加して 1 時間室温で静置した。続いて 0.25 M NaOH で 8 倍に希釈した Emerald II (TROPIX) を 100 μ L 加えて直ちにルミノメーター (Microplate Luminometer LB 96V ; Berthold) で化学発光を測定した。検量線用として β -galactosidase を 1 μ g/mL から 100 pg/mL まで 10 倍ずつ 0.1 % BSA (ウシ血清アルブミン) を含む reaction buffer で希釈し、同様に測定した。

上清中のタンパク質量は Bradford 法で測定した。上清 10 μ L に 5 倍希釈した dye reagent (BIO-RAD) 200 μ L を加えて室温で約 10 分間静置した。続いて MICRO PLATEREADER MODEL 680 (BIO-RAD) を使用して 595 nm の吸光度を測定した。検量線用として BSA を 0.5, 0.4, 0.25, 0.125, 0.05 mg/mL となるように精製水で希釈し、同様に測定した。

続いて、タンパク質量あたりの β -galactosidase 産生量を算出し、DMSO と DAP-PGN のみを添加した場合の値を 100%, DMSO のみを添加した場合の値を 0% とした時の各試料の値を自然免疫活性とした。

自然免疫応答制御物質の検出系 (*Att-luc* 系)

Attacin プロモーター下流に *luciferase* 遺伝子を持つプラスミドを導入した S2 細胞 ($\text{S2}^{\text{Att-luc}}$) を、10% FBS を含む SDM で 6×10^4 cells/mL に調製し、96-well plate (FALCON) の各 well に 85 μ L 分注した。25°C で 12 時間培養した後、SDM で 20 倍に希釈した試料を 10 μ L 加え、25 °C で 1.5 時間培養した。続いて DAP-PGN を最終濃度 100 ng/mL になるよう

に 5 μ L ずつ加え, 25°C で 8 時間培養した. 培養後の細胞に Glo-lysis buffer (Promega) を加えて溶解し, luciferase 測定用のサンプルとした. Luciferase 活性の測定は One-Glo (Promega) を用いて行い, ルミノメーター (Microplate Luminometer LB 96V ; Berthold) で化学発光を測定した. 検量線用として luciferase を 1 ng/mL から 1 pg/mL まで 10 倍ずつ希釈し, 同様に測定した. Luciferase 産生量を算出し, DMSO と DAP-PGN のみを添加した場合の値を 100%, DMSO のみを添加した場合の値を 0% とした時の各試料の値を自然免疫活性とした.

S2 細胞を用いた細胞毒性評価 (S2 細胞系)

S2 細胞を 20% FBS, 1% Antibiotics-Antimycotic (GIBCO) を含んだ SDM で 4×10^5 cells/mL に調製し, 96-well plate (FALCON) の各 well に 100 μ L ずつ分注した. 培地には試料を最終濃度 0.5% (v/v) になるように添加した. 25 °C で 24 時間培養した後, WST-8 試薬 (生細胞数測定試薬 SF : nacalai tesque) を各 well に 10 μ L ずつ分注した. 分注直後および 4 時間後に MICRO PLATE READER MODEL 680 (BIO-RAD) を使用して 450 nm の吸光度を測定した. 4 時間後の吸光度から 0 時間後の吸光度を引き, 培地に DMSO のみを添加した well を 100% とし, 培地のみで細胞を蒔いていない well を 0% とし, 細胞生存率を算出した.

hs-GAL4/UAS-lacZ 系のショウジョウバエを用いた自然免疫応答非特異的抑制活性の評価系 (*hs-lacZ* 系)

heat shock プロモーター下流に GAL4 遺伝子と, GAL4 の認識配列である UAS 下流にレポーター遺伝子 *lacZ* を導入したショウジョウバエ (*hs-GAL4/UAS-lacZ*) を用いた. 3 齢幼虫を, 70% ethanol で滅菌後, クリーンベンチ内で低温条件下 (4 °C) で解剖した. 解剖した幼虫を 96-well plate の各 well に 1 匹ずつ入れた. 37 °C で 30 分培養し熱刺激を与えた後, 25 °C で 18 時間培養した. 培養には 20% FBS, 1% Antibiotics-Antimycotic (GIBCO) を含む SDM を用いた. 試料は培地に最終濃度 0.5% (v/v) となるように添加し, negative control には T-2

toxin を最終濃度 100 μ M となるように加えた.

アッセイは *Dpt-lacZ* 系と同様に行い, タンパク質量あたりの β -galactosidase 産生量を算出した. DMSO のみを添加した場合を 100%, T-2 toxin を 100 μ M 添加した場合を 0% として各試料の値とした.

HUVEC を用いた TNF- α 刺激性サイトカインアッセイ

HUVEC を EGM-2 (EGM-2 Bullet Kit, Lonza) で 3×10^4 cells/mL に調製し, 96 well plate の各 well に 100 μ L ずつ分注した. 37°C で 24 時間培養した後, 培地を除き, 試料を含む培地を各 well に 100 μ L ずつ加えた. 1.5 または 3 時間の前処理後, TNF- α (10 ng/mL) を培地中に最終濃度 1 ng/mL となるように 11 μ L ずつ添加した. 37°C で 12 時間培養後, 培地を回収しサイトカイン産生量の測定用サンプルとした.

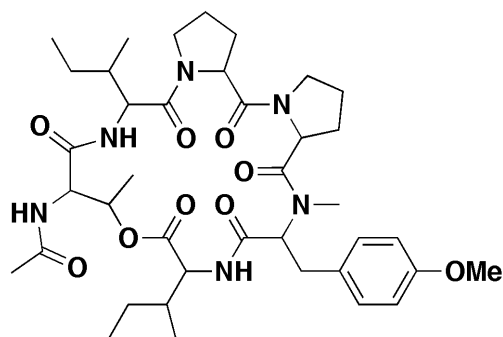
IL-8 の産生量は Immunoassay Kit (Biosource) を用いてプロトコールにしたがって定量した. 培地に DMSO と TNF- α のみを添加した場合の値を 100%, DMSO のみを添加した場合の値を 0% として各試料の値を算出した.

第 1 章の実験

糸状菌 *Aspergillus* sp. *n*-BuOH 抽出物の分画

メルシャン株式会社により培養され提供された糸状菌 *Aspergillus* sp. の培養液 (2 L) を濾過により菌体と培地に分離した後、菌体は室温下で *n*-BuOH (2 L) を用いて、3 回繰り返し抽出した。得られた抽出液を減圧濃縮し、*n*-BuOH 抽出物 (20.47 g) を得た。培地は *n*-BuOH (1.5 L) で 3 回抽出し、減圧濃縮して *n*-BuOH 可溶画分 (5.96 g) を得た。さらに残った水層を減圧濃縮して、H₂O 可溶画分 (66.3 g) を得た。培地 *n*-BuOH 可溶画分 (5.96 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-hexane-EtOAc, EtOAc, EtOAc-MeOH, MeOH, MeOH-H₂O で順次溶出させ、Fraction 1 (355.3 mg, *n*-hexane-EtOAc (4:1)-EtOAc-MeOH (9:1)), Fraction 2 (3407.3 mg, EtOAc-MeOH (9:1-4:1)), Fraction 3 (948.3 mg, EtOAc-MeOH (4:1-1:1)), Fraction 4 (998.1 mg, EtOAc-MeOH (1:1)-MeOH-H₂O (9:1)) を得た。

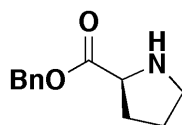
新規デブシペプチド 8 の単離



自然免疫抑制活性を示した Fraction 2 をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃, CHCl₃-MeOH (99:1-1:1), MeOH で順次溶出させ、Fraction 2-1~4 を得た。Fraction 2-1 (294.9 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃, CHCl₃-MeOH (99:1-1:1), MeOH で順次溶出させ、Fraction 2-1-1~9 を得た。Fraction 2-1-4 (13.0 mg) を、HPLC (Column: GS310-A, Elutant: CHCl₃-MeOH (2:1), WL: 250 nm, Flow: 5 mL/min) で分離し、Fraction 2-1-4-1~10 を得た。Fraction 2-1-4-4 (2.2 mg) を ODS カラムクロマトグラフィーに付し、H₂O-CH₃CN (9:1-1:1), CH₃CN, EtOAc で順次溶出させ、H₂O-CH₃CN (1:1) の溶出画分

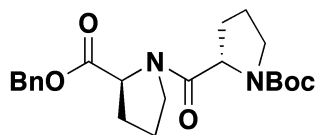
より，新規デプシペプチド **8** (1.3 mg) を得た．**8**: Colorless oil; ^1H and ^{13}C NMR data are shown in Table 1; LRFABMS: m/z 755 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (base); HRFABMS: m/z 755.4343 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (755.4343 calcd. for $\text{C}_{39}\text{H}_{59}\text{O}_9\text{N}_6$).

O-Benzyl-L-Pro (15) の合成



L-Pro (**13**) (500.2 mg, 4.3 mmol) を室温において toluene (40 mL) に溶かし，benzyl alcohol (1.8 mL, 17.3 mmol), *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (908.7 mg, 4.8 mmol) を順次加え，10 時間加熱還流した．反応液に飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加え，EtOAc で 3 回抽出した．得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し，無水硫酸ナトリウムで乾燥後，減圧下溶媒を留去した．残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し， CHCl_3 , CHCl_3 -MeOH (99:1-19:1) 溶出画分より，**15** (744.5 mg, 83%) を得た．**15**: colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.28-7.35 (5H, m), 5.13 (2H, s), 3.77 (1H, dd, $J = 8.8, 5.6$ Hz), 3.04 (1H, ddd $J = 13.6, 10.0, 6.8$ Hz), 2.86 (1H, ddd, $J = 13.6, 10.4, 6.8$ Hz), 2.68 (1H, br. s), 2.05-2.15 (1H, m), 1.79-1.90 (1H, m), 1.66-1.76 (2H, m); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 174.8, 135.4, 128.2, 127.9, 127.7, 66.2, 59.3 46.6, 29.8, 25.1; LRFABMS: m/z 206 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

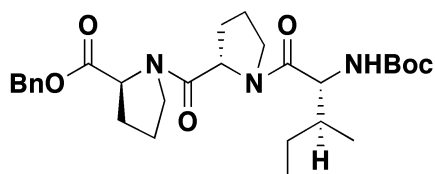
Dipeptide: Boc-L-Pro-L-Pro-OBn (16) の合成



化合物 **15** (207.9 mg, 1.0 mmol) を DMF (4.0 mL) に溶かし，0 °C において Boc-L-Pro-OH (224.3 mg, 1.0 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (530 μL , 3.0 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (234.4 mg, 1.5 mmol), EDCI (291.1 mg, 1.5 mmol) を順次加えて，0.5 時間攪拌後，室温で 2.5 時間攪拌した．反応液に 1 M HCl を加え EtOAc で 3 回抽出した．得られた有機層を飽和

炭酸水素ナトリウム溶液・飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒を留去した。その残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-hexane-EtOAc (2:1-1:1) 溶出画分より **16** (269.6 mg, 66%) を得た。 **16**: colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.28-7.35 (5H, m), 5.23 (1.2H, s), 5.06 (0.8H, s), 4.64 (1H, dd, $J = 8.2, 4.6$ Hz), 4.49 and 4.38 (1H, dd $J = 7.6, 2.0$ Hz), 3.3-3.8 (4H, m), 1.74-2.25 (8H, m), 1.45-1.39 (9H, s); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.9 (0.6C), 171.6 (0.4C), 171.4 (0.4C), 170.9 (0.6C), 154.3 (0.6C), 153.5 (0.4C), 135.5 (0.6C), 135.4 (0.4C), 128.3 (0.6C), 128.3 (0.4C), 128.0 (0.4C), 128.0 (0.6C), 127.9 (0.4C), 127.9 (0.6C); 79.2 (0.6C), 79.2 (0.4C), 66.6 (0.4C), 66.5 (0.6C), 58.6, 57.4 (0.4C), 57.4 (0.6C), 46.6 (0.6C), 46.4 (0.4C), 46.3 (0.4C), 46.2 (0.6C), 29.6, 28.7 (0.6C), 28.6 (0.4C), 28.2 (0.6C), 28.1 (0.4C), 24.8 (0.4C), 24.7 (0.6C), 23.8 (0.6C), 23.3 (0.4C) (アミド結合による互変異性のため、複数の構造に由来するシグナルが観察された); LRFABMS: m/z 403.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 303 (base), 206; HRFABMS: m/z 403.2254 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (403.2202 calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_5\text{N}_2$).

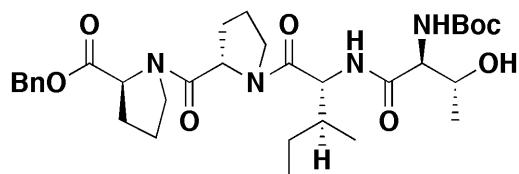
Tripeptide: Boc-D-*allo*-Ile-L-Pro-L-Pro-OBn (**17**) の合成



化合物 **16** (269.6 mg, 0.67 mmol) を CH_2Cl_2 (2.0 mL) に溶かし、 0°C において trifluoroacetic acid (0.4 mL) を加えて、0.5 時間攪拌後、室温で 1.5 時間攪拌した。反応液を減圧下留去した後、残渣を DMF (3.3 mL) に溶かし、 0°C において Boc-D-*allo*-Ile-OH (158.6 mg, 0.73 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (350 μL , 2.0 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (158.9 mg, 1.0 mmol), EDCI (196.9 mg, 1.0 mmol) を順次加えて、0.5 時間攪拌後、室温で 2.5 時間攪拌した。反応液に 1 M HCl を加え EtOAc で 3 回抽出した。得られた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム溶液・飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒を留去した。その残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-hexane-EtOAc (2:1-1:4) 溶出画分より **17** (223.5 mg, 65%) を得た。 **17**: colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.28-7.35 (5H, m), 5.29 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 5.21 (1.2H, s), 5.06 (0.8H, s), 4.66 (1H, dd, $J = 8.2, 4.6$ Hz), 4.60

(1H, dd $J = 8.8, 3.6$ Hz), 4.50 (1H, dd, $J = 8.8, 4.4$ Hz) 3.79-3.89 (2H, m), 3.50-3.65 (2H, m), 1.87-2.25 (8H, m), 1.68 (1H, m), 1.45 (1H, m), 1.41 (9H, s), 1.14-1.25 (1H, m), 0.97 (3H, t, $J = 7.6$ Hz), 0.86 (3H, d, $J = 6.8$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.8, 170.4, 170.0, 155.3, 135.4, 128.3 (0.6C), 128.2 (0.4C), 127.9 (0.4C), 127.9 (0.6C), 127.8; 78.9, 66.5, 58.5, 57.7, 54.7, 46.9, 46.3, 38.0, 28.5, 28.1, 28.0, 26.4, 24.6, 24.2, 13.7, 11.7 (アミド結合による互変異性のため, 複数の構造に由来するシグナルが観察された); LRFABMS: m/z 516 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 416, 303 (base); HRFABMS: m/z 516.3080 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (516.3068 calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{N}_3$).

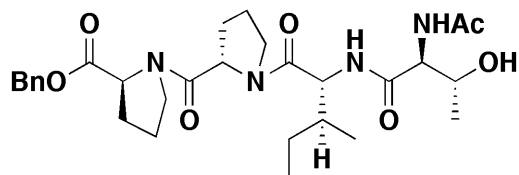
Tetrapeptide: Boc-L-Thr-D-*allo*-Ile-L-Pro-L-Pro-OBn (**18**) の合成



化合物 **17** (220.0 mg, 0.43 mmol) を CH_2Cl_2 (2.0 mL) に溶かし, 0°C において trifluoroacetic acid (0.4 mL) を加えて, 0.5 時間攪拌後, 室温で 1.5 時間攪拌した. 反応液を減圧下留去した後, 残渣を DMF (2.1 mL) に溶かし, 0°C において Boc-L-Thr-OH (107.9 mg, 0.47 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (230 μL , 1.3 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (100.2 mg, 0.64 mmol), EDCI (126.8 mg, 0.64 mmol) を順次加えて, 0.5 時間攪拌後, 室温で 2.5 時間攪拌した. 反応液に 1 M HCl を加え EtOAc で 3 回抽出した. 得られた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム溶液・飽和食塩水で洗浄し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 減圧下溶媒を留去した. その残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl_3 -MeOH (99:1-19:1) 溶出画分より **18** (250.2 mg, 95%) を得た. **18**: colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.28-7.35 (5H, m), 6.72 (1H, d, $J = 9.6$ Hz), 5.59 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 5.17 (1.2H), 5.09 (0.8H, s), 4.68 (1H, dd, $J = 9.6, 8.8$ Hz), 4.60 (1H, dd $J = 8.8, 3.6$ Hz), 4.54 (1H, dd, $J = 8.8, 4.0$ Hz), 4.42 (1H, br. s), 4.20 (1H, br. s), 3.73-3.80 (2H, m), 3.50-3.62 (2H, m), 2.65 (1H, br. s), 1.79-2.23 (8H, m), 1.35-1.58 (2H, m), 1.44 (9H, s), 1.10-1.25 (1H, m), 1.18 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.93 (6H, m); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.8 (0.4C), 171.5 (0.6C), 171.6, 170.8, 170.5, 155.7, 135.4, 128.4 (0.6C) 128.3 (0.4C), 128.3

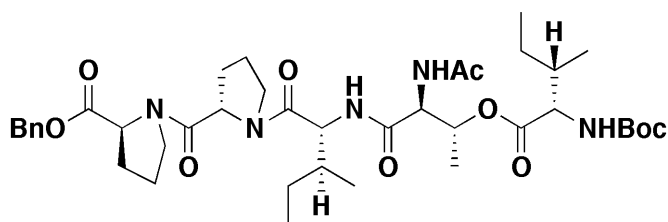
(0.4C), 128.2 (0.6C), 128.2 (0.4C), 128.1 (0.6C), 79.7, 67.7, 66.7 (0.6C), 66.5 (0.5C), 60.2, 58.7, 57.8, 54.4, 47.5, 46.5, 36.3, 28.5, 28.1, 27.9, 26.1, 24.8, 24.6, 19.9, 14.2, 11.4 (アミド結合による互変異性のため, 複数の構造に由来するシグナルが観察された); LRFABMS: m/z 617 $[M+H]^+$ 517, 303 (base); HRFABMS: m/z 617.3543 $[M+H]^+$ (617.3555 calcd. for $C_{32}H_{49}O_8N_4$).

Tetrapeptide: Ac-L-Thr-D-*allo*-Ile-L-Pro-L-Pro-OBn (**19**) の合成



化合物 **18** (123.6 mg, 0.20 mmol) を CH_2Cl_2 (2.0 mL) に溶かし, $0^\circ C$ において trifluoroacetic acid (0.3 mL) を加えて, 0.5 時間攪拌後, 室温で 1 時間攪拌した. 反応液を減圧下留去した後, 残渣を CH_2Cl_2 (2.0 mL) に溶かし, $0^\circ C$ において *N,N*-diisopropylethylamine (140 μ L, 0.8 mmol), acetic anhydride (40 μ L, 0.44 mmol) を順次加えて, 0.5 時間攪拌した. 反応液に 1 M HCl を加え EtOAc で 3 回抽出した. 得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 減圧下溶媒を留去した. その残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, $CHCl_3$ -MeOH (49:1-9:1) 溶出画分より **19** (103.2 mg, 92%) を得た. **19**: colorless oil; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.28-7.40 (5H, m), 6.77 (1H, d, $J = 9.6$ Hz), 5.17 (1.2H, s), 5.08 (0.8H, s), 4.68 (1H, dd, $J = 9.6, 8.8$ Hz), 4.60 (1H, dd $J = 8.8, 3.6$ Hz), 4.54 (1H, dd, $J = 8.8, 4.0$ Hz), 4.42 (1H, d, $J = 6.4$ Hz), 4.37 (1H, dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz), 4.28 (1H, br. s), 4.28 (1H, br. s), 4.00 (1H, br. s), 3.65-3.80 (2H, m), 3.50-3.62 (2H, m), 1.75-2.25 (8H, m), 2.07 (3H, s), 1.36-1.44 (1H, m), 1.10-1.25 (2H, m), 1.14 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.87-0.97 (6H, m); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 171.6, 170.8, 170.7, 170.6, 170.4, 135.4, 128.4, 128.2, 128.0, 66.7, 66.5, 60.2, 58.8, 58.4, 57.9, 47.4, 46.5, 36.3, 28.6, 27.9, 26.2, 24.7, 24.3, 22.9, 14.2, 11.4 (アミド結合による互変異性のため, 複数の構造に由来するシグナルが観察された); LRFABMS: m/z 559 $[M+H]^+$ 303 (base); HRFABMS: m/z 559.3148 $[M+H]^+$ (559.3119 calcd. for $C_{29}H_{43}O_7N_4$).

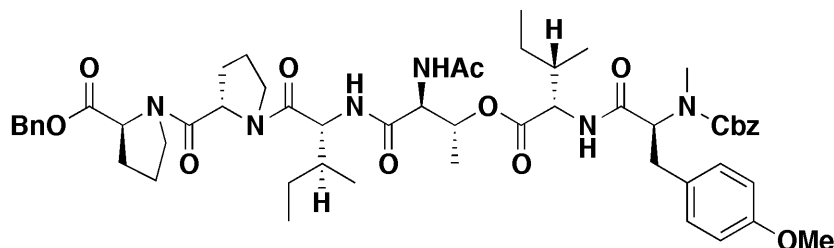
Depsipeptide: Boc-L-*allo*-Ile-N-Ac-L-Thr-D-*allo*-Ile-L-Pro-L-Pro-OBn (20) の合成



化合物 **19** (62.8 mg, 0.12 mmol) を CH_2Cl_2 (2.0 mL) に溶かし、室温において Boc-L-*allo*-Ile (27.0 mg, 0.12 mmol), *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (3.0 mg, 0.024 mmol), triethylamine (100 μL , 0.72 mmol), 2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride (80.5 mg, 0.24 mmol) を順次加えて、7.5 時間攪拌した。反応液に 1 M HCl を加え EtOAc で 3 回抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒を留去した。その残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、 CHCl_3 -MeOH (99:1-79:1) 溶出画分より **20** (59.0 mg, 66%) を得た。**20**: colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.11 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.28-7.40 (5H, m), 6.78 (1H, d, $J = 9.6$ Hz), 5.20 (1.2H, s), 5.17 (0.8H, s), 4.90 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 4.58-4.80 (5H, m), 4.30 (1H, d, $J = 3.6$ Hz), 4.23 (1H, dd, $J = 9.2, 4.8$ Hz), 4.07 (1H, br. s), 3.65-3.82 (2H, m), 3.45-3.63 (2H, m), 1.75-2.30 (9H, m), 2.04 (3H, s), 1.60-1.75 (2H, m), 1.36-1.44 (1H, m), 1.43 (9H, s), 1.10-1.25 (2H, m), 1.25 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.87-0.97 (12H, m); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.9, 171.4, 170.5, 170.0, 168.2, 168.0, 156.9, 135.5, 128.4, 128.2, 128.0, 79.5, 66.7, 66.5, 60.2, 58.7, 58.0, 57.5, 47.3, 46.5, 36.7, 28.6, 28.2, 27.8, 26.6, 24.9, 24.8, 24.4, 22.9, 14.2, 14.1, 11.7, 11.4 (アミド結合による互変異性のため、複数の構造に由来するシグナルが観察された); LRFABMS: m/z 772 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 672.5, 303 (base); HRFABMS: m/z 772.4510 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (772.4493 calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{62}\text{O}_{10}\text{N}_5$).

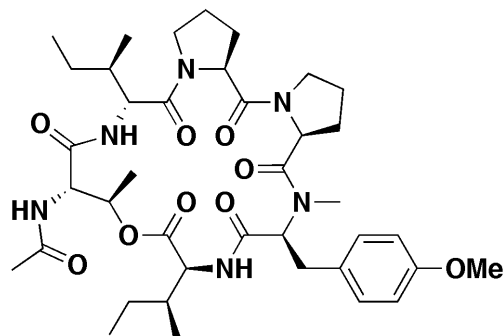
Depsipeptide: Cbz-*N,O*-dimethyl-L-Tyr-L-*allo*-Ile-N-Ac-L-Thr-D-*allo*-Ile-L-Pro-L-Pro-OBn

(14) の合成



化合物 **20** (59.7 mg, 0.077 mmol) を CH_2Cl_2 (3.0 mL) に溶かし、 0°C において trifluoroacetic acid (0.3 mL) を加えて、0.5 時間攪拌後、室温で 0.5 時間攪拌した。反応液を減圧下留去した後、残渣を CH_2Cl_2 (1.0 mL) に溶かし、 0°C において Cbz-*N,O*-dimethyl-L-Tyr-OH (31.6 mg, 0.092 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (50 μL , 0.26 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (19.3 mg, 0.1 mmol), EDCI (24.9 mg, 0.13 mmol) を順次加えて、0.5 時間攪拌後、室温で 5 時間攪拌した。反応液に 1 M HCl を加え EtOAc で 3 回抽出した。得られた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム溶液・飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒を留去した。その残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、 CHCl_3 -MeOH (99:1-49:1) 溶出画分より **14** (47.5 mg, 57%) を得た。**14**: colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.20-7.36 (10H, m), 7.12 (1.2H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.01 (0.8H d, $J = 8.0$ Hz), 6.79 (1.2H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.74 (0.8H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.73 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 5.42 (1H, m), 5.00-5.24 (4H, m), 4.94 (1H, m), 4.34-4.80 (5H, m), 3.65-3.82 (2H, m), 3.76 (3H, s), 3.45-3.63 (2H, m), 3.25-3.35 (1H, m), 2.85-2.97 (1H, m), 2.83 (3H, s), 2.70-2.80 (1H, m), 1.75-2.30 (9H, m), 2.04 (3H, s), 1.60-1.75 (1H, m), 1.30-1.46 (2H, m), 1.08-1.20 (2H, m), 1.22 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.80-0.97 (12H, m); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.8, 170.7, 170.2, 170.1, 169.6, 169.0, 168.3, 158.2, 136.6, 135.5, 129.7, 129.1, 128.4, 128.2, 128.0, 127.7, 113.8, 71.0, 66.9, 66.7, 60.5, 58.9, 58.7, 58.3, 57.9, 56.3, 47.2, 46.6, 37.8, 36.7, 32.9, 30.8, 28.6, 28.1, 26.6, 24.9, 24.8, 24.4, 22.8, 16.5, 14.4, 14.2, 11.7, 11.5 (アミド結合による互変異性のため、複数の構造に由来するシグナルが観察された); LRFABMS: m/z 997 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 831, 582, 303 (base); HRFABMS: m/z 997.5292 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (997.5287 calcd. for $\text{C}_{54}\text{H}_{73}\text{O}_{12}\text{N}_6$).

Aspergillicin E (11) の合成



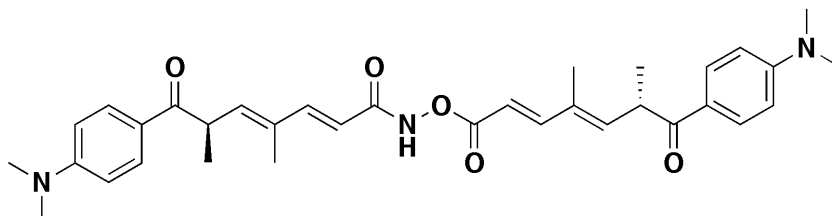
化合物 **14** (40.7 mg, 0.041 mmol) を MeOH (1.5 mL) に溶かし, 5% パラジウム炭素 (5.0 mg) を加え, 水素雰囲気下室温で 3.0 時間攪拌後, 反応液を濾過し, 減圧下溶媒留去した. 残渣を CH₂Cl₂ (36.0 mL) に溶かし, 室温において *N,N*-diisopropylethylamine (20 μ L, 0.11 mmol), (*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate) (20.9 mg, 0.055 mmol) を順次加えて, 25 時間攪拌した. 反応液に 1 M HCl を加え EtOAc で 3 回抽出した. 得られた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム溶液・飽和食塩水で洗浄し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 減圧下溶媒を留去した. その残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl₃-MeOH (89:1-79:1) 溶出画分より Aspergillicin E (**11**) (12.0 mg, 30%) を得た. **11**: colorless oil; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.15 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.03 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.84 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.80 (1H, d, *J* = 10.4 Hz), 6.61 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 5.60 (1H, dq, *J* = 6.6, 2.4 Hz), 4.97 (1H, dd, *J* = 11.6, 4.0 Hz), 4.86 (1H, dd, *J* = 10.0, 2.8 Hz), 4.68 (1H, dd, *J* = 8.8, 4.8 Hz), 4.61 (1H, dd, *J* = 9.2, 7.6 Hz), 4.50 (1H, dd, *J* = 8.4, 5.2 Hz), 4.30 (1H, dd, *J* = 8.4, 5.2 Hz), 3.78 (3H, s), 3.59-3.72 (2H, m), 3.49-3.58 (2H, m), 3.17 (1H, dd, *J* = 14.8, 3.6 Hz), 2.98 (1H, dd, *J* = 14.0, 12.0 Hz), 2.82 (3H, s), 1.8-2.3 (9H, m), 2.15 (3H, s), 1.55-1.80 (2H, m), 1.05-1.44 (3H, m), 1.2 (3H, d, *J* = 10.4 Hz), 0.83-0.95 (12H, m); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.2, 171.6, 171.0, 170.9, 169.8, 168.3, 158.7, 130.4, 129.6, 114.3, 71.6, 62.5, 58.2, 56.3, 55.8, 55.4, 55.1, 54.6, 47.4, 47.3, 37.1, 36.8, 33.6, 29.3, 28.5, 26.4, 25.4, 24.6, 23.1, 16.5, 14.9, 14.4, 11.7, 11.6; LRFABMS: *m/z* 755 [M+H]⁺

第 2 章の実験

放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* の *n*-BuOH 抽出物の分画

メルシャン株式会社により培養され提供された放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* の培養液 (20 L) を室温下で *n*-BuOH (16 L) を用いて、3 回繰り返し抽出した。得られた抽出液を減圧濃縮し、*n*-BuOH 抽出物 (92.92 g) を得た。これに、3.5 L の水を加えて懸濁させた後、酢酸エチル (3 L) で 3 回抽出し、減圧濃縮して、酢酸エチル可溶画分 (52.73 g) を得た。次に残った水層を *n*-BuOH (3 L) で 3 回抽出し、減圧濃縮して *n*-BuOH 可溶画分 (34.10 g) を得た。さらに、残った水層を減圧濃縮し H₂O 可溶画分 (12.61 g) を得た。酢酸エチル可溶画分 (52.73 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-hexane-EtOAc, EtOAc, EtOAc-MeOH, MeOH, MeOH-H₂O で順次溶出させ、Fraction 1 (10.20 g, *n*-hexane-EtOAc (9:1-3:1)), Fraction 2 (0.93 g, *n*-hexane-EtOAc (1:1)), Fraction 3 (3.52 g, *n*-hexane-EtOAc (1:3-0:1)), Fraction 4 (34.11 g, EtOAc-MeOH (9:1-4:1)), Fraction 5 (1.78 g, EtOAc-MeOH (2:1)), Fraction 6 (1.68 g, EtOAc-MeOH (4:1)-MeOH-H₂O (9:1)) を得た。

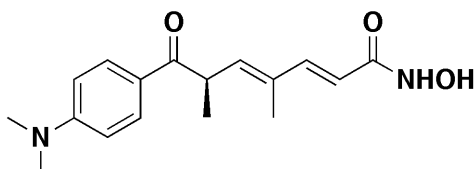
新規 trichostatin 誘導体 9 の単離



自然免疫応答抑制作用を示した Fraction 3 (3.52 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃, CHCl₃-MeOH (99:1-49:1), MeOH で順次溶出させ、Fraction 3-1~4 を得た。Fraction 3-2 (912.9 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃, CHCl₃-MeOH (99:1-49:1), MeOH で順次溶出させ、Fraction 3-2-1~4 を得た。Fraction 3-2-2 をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-hexane-EtOAc (2:1-1:4), MeOH で順次溶出させ、Fraction 3-2-2-1-6 を得た。Fraction 3-2-2-5 (85.7 mg) を ODS カラムクロマトグラフィーに付し、H₂O-CNCH₃ (9:1-1:9), CNCH₃ で順次溶出させ、Fraction 3-2-2-5-1~10 を得た。Fraction 3-2-2-5-8 (19.8 mg) を GPC HPLC (column: GS310, elutant: CHCl₃-MeOH (2:1), WL:

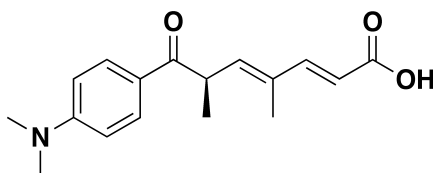
250 nm, flow rate: 5.0 mL/min) で分離し, 化合物 **9** (10.3 mg) を得た. **9**: yellow oil; ^1H and ^{13}C data are shown in Table 2; LRFABMS: m/z 572 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRFABMS: m/z 572.3138 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (572.3114 calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{O}_5\text{N}_3$).

Trichostatin A (**25**) の単離



Att-luc 系において自然免疫応答抑制作用を示した Fraction 3-4 (1426.4 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, *n*-hexane-EtOAc (4:1-1:4), EtOAc, EtOAc-MeOH (19-1), MeOH で順次溶出させ, Fraction 3-4-1-7 を得た. Fraction 3-4-5 (916.0 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl_3 -MeOH (99:1-1:1), MeOH で順次溶出させ, Fraction 3-4-5-1~5 を得た. Fraction 3-4-5-5 (111.6 mg) を ODS カラムクロマトグラフィーに付し, H_2O -MeOH (9:1-3:7), MeOH, EtOAc で順次溶出させ, H_2O -MeOH (7:3-1:1) の溶出画分より trichostatin A (**25**) (19.1 mg) を得た. Trichostatin A (**25**): yellow oil; ^1H data are shown in Table 2; LRFABMS: m/z 303 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRFABMS: m/z 303.1720 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (303.1684 calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_3\text{N}_2$).

Trichostatic acid (**26**) の単離



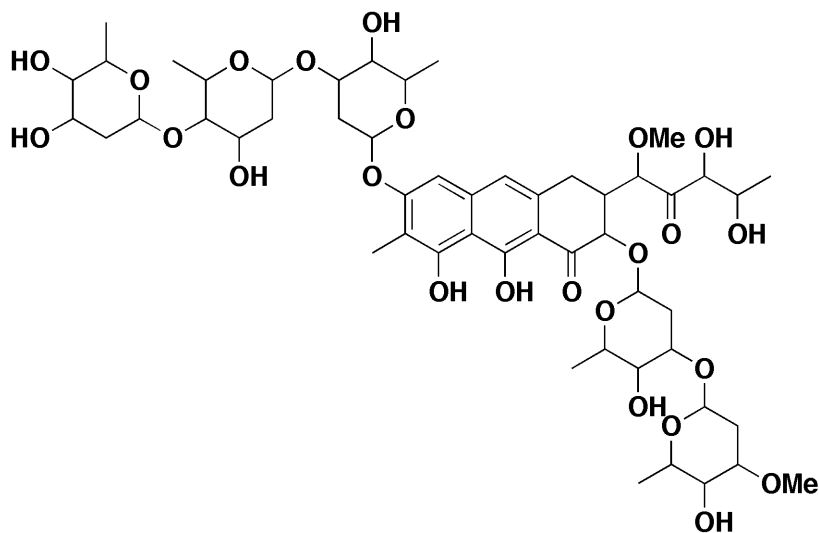
Fraction 3-2-2-5-4 (18.8 mg) を GPC HPLC (column: GS310, elutant: CHCl_3 -MeOH (2:1), WL: 250 nm, flow rate: 5.0 mL/min) で分離し, trichostatic acid (**26**) (10.3 mg) を得た. Trichostatic acid (**26**): yellow oil; ^1H data are shown in Table 2; LRFABMS: m/z 288 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

第 3 章の実験

放線菌 *Streptomyces* sp. EtOH 抽出物の分画

微生物化学研究所により培養され提供された放線菌 *Streptomyces* sp. の EtOH 抽出物 (21.68) に、1 L の水を加えて懸濁させた後、*n*-BuOH (800 mL × 3) で抽出し、減圧濃縮して *n*-BuOH 可溶画分 (4.13 g) を得た。さらに、残った水槽を減圧濃縮し H₂O 可溶画分 (2.19 g) を得た、*n*-BuOH 可溶画分 (4.13 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-hexane-EtOAc, EtOAc, EtOAc-MeOH, MeOH, MeOH-H₂O で順次溶出させ、Fraction 1 (1024.5 mg, *n*-hexane-EtOAc (9:1)), Fraction 2 (306.1 mg, *n*-hexane-EtOAc (9:1-1:1)), Fraction 3 (369.7 mg, *n*-hexane-EtOAc (1:1)-EtOAc-MeOH (9:1)), Fraction 4 (233.2 mg, EtOAc-MeOH (9:1-4:1)), Fraction 5 (915.3 mg, EtOAc-MeOH (4:1)-MeOH), Fraction 6 (670.6 mg, MeOH-H₂O (9:1)) を得た。

新規オーレオリン酸類化合物 (10) の単離



転写・翻訳抑制作用を示した Fraction 5 をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃, CHCl₃-MeOH (99:1-1:1), MeOH で順次溶出させ、Fraction 5-1~5 を得た。Fraction 5-3 (276.6 mg) を CHCl₃ に懸濁させ、懸濁液を濾過した後、残渣を MeOH に溶かし、減圧下溶媒を留去し、Fraction 5-3-M を得た。Fraction 5-3-M (196.2 mg) を GPC HPLC (column:

GS310, elutant: MeOH, WL: 250 nm, flow rate: 5.0 mL/min) で分離し, 化合物 (**10**) (40.8 mg) を得た. **10**: yellow amorphous solid; ^1H and ^{13}C data are shown in Table 3; LRFABMS: m/z 1083 [M-H] $^-$; HRFABMS: m/z 1083.4637 [M-H] $^-$ (1083.5637 calcd. for $\text{C}_{52}\text{H}_{75}\text{O}_{24}$).

参考文献

1. Beverler, P. *Curr. Opin. Immunol.* **1991**, 3, 355-360.
2. Medzhitov, R.; Janeway, C. A., Jr. *Cell* **1997**, 91, 295-298.
3. 笹月健彦 免疫生物学 -免疫系の正常と病理- 原書第3版, **1998**, 344-364.
4. Kaneko, K.; Ueda, R.; Kikuchi, K.; Sano, Y.; Yoshimura, T. *J. Chromatogr. B* **1999**, 736, 67-75.
5. Hoffmann, J. A.; Kafatas, F. C.; Janeway, C. A.; Ezekowitz, R. A. *Science* **1999**, 284, 1313- 1318.
6. Hoffmann, J. A. *Nature* **2003**, 426, 33-38.
7. Hoffmann, J. A.; Reichhart, J. M. *Nat. Immunol.* **2002**, 3, 121-126.
8. Roebuck, K. A.; Carpenter, L. R.; Lakshminarayanan, V.; Page, S. M.; Moy, J. N.; Thomas, L. L. *J. Leukoc. Biol.* **1999**, 65, 291-298.
9. Sekiya, M.; Ueda, K.; Fujita, T.; Kitayama, M.; Kikuchi, H.; Oshima, Y.; Kurata, S. *Life Sci.* **2006**, 80, 113-119.
10. Yajima, M.; Takada, M.; Takahashi, N.; Kikuchi, H.; Natori, S.; Oshima, Y.; Kurata, S. *Biochem. J.* **2003**, 371, 205-210.
11. 高田正俊 学士論文, 東北大学薬学部 **2000**.
12. Hoffmann, J. A.; Reichhart, J. M. *Trends Cell Biol.* **1997**, 7, 309-316.
13. 関谷瑞樹 博士論文, 東北大学大学院薬学研究科 **2008**.
14. Kikuchi, H.; Sekiya, M.; Katoh, Y.; Ueda, K.; Kabeya, T.; Kurata, S.; Oshima, Y. *Org. Lett.* **2009**, 11, 1693-1695.
15. 有泉加奈子 修士論文, 東北大学大学院薬学研究科 **2009**.
16. Kikuchi, H.; Isobe, M.; Sekiya, M.; Abe, Y.; Hoshikawa, T.; Ueda, K.; Kurata, S.; Katoh, Y.; Oshima, Y. *Org. Lett.* **2011**, 13, 4624-4627.
17. Capon, R. J.; Skene, C.; Stewart, M.; Ford, J.; O'Hair, R. A. J.; Williams, L.; Lacey, E.; Gill, J. H.; Heiland, K.; Friedel, T. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 1856-1862.
18. Anteunis, M. J. O.; Sharma, N. K. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1988**, 97, 281.

19. Kopple, K. D. *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61*, 1345.
20. Wen, J.; Packham, G.; Ganesan, A. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 9353-9361.
21. Mori, K.; Koseki, K. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6013-3020.
22. Tsuji, N.; Kobayashi, M. *J. Antibiot.* **1978**, *31*, 939.
23. Finnin, M. S.; Donigian, L. R.; Cohen, A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A.; Marke, P. A.; Breslow, R.; Pavletich, N. P. *Nature* **1999**, *401*, 188– 193
24. Hoshikawa, Y.; Kwon, H. J.; Yoshida, M.; Horinouchi, S.; Beppu, T. *Exp. Cell Res.* **1994**, *214*, 189-197.
25. Futamura, M.; Monden. Y.; Okabe, T.; Fujita-Yoshigaki, J.; Yokoyama, S.; Nishimura, S. *Oncogene* **1995**, *16*, 1119-1123.
26. Masuoka, Y.; Shin-ya, K.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 1058-1060.
27. Gupta, S.; Peiser, G.; Nakajima, T.; Hwang, Y. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6009-6012.
28. 中村哲也 修士論文, 東北大学大学院薬学研究科 **2011**.
29. Bode, K. A.; Dalpke, A. H. *Blood* **2011**, *117*, 1102-1103.
30. Thiem, J.; Meyer, B. *Tetrahedron* **1988**, *37*, 551-558.
31. Grundy, W. E.; Goldstein, A. W.; Rickher, J. C.; Hanes, M. E.; Warren, H. B.; Sylvester, J. C. *Antimicrob. Chemother.* **1953**, *3*, 1215-1221.
32. Katahira, R.; Katahira, M.; Yamashita, Y.; Ogawa, H.; Kyogoku, Y.; Yoshida, M. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *32*, 6588-6604
33. Sastry, M.; Patel, D. J. *Biochemistry* **1993**, *53*, 788-792.
34. Rohr, J.; Méndez, C.; Salas, J. A. *Bioorg. Chem.* **1999**, *27*, 41-54.
35. Sato, K.; Okamura, N.; Utagawa, K.; Ito, ; Watanabe, M. *Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ.* **1960**, *9*, 224-232.
36. Ogawa, H.; Yamashita, Y.; Katahira, R.; Chiba, S.; Iwasaki, T.; Ashizawa, T.; Nakano, H. *J. Antibiot.* **1998**, *5*, 261-266.

37. Baig, I.; Perez, M.; Braña, A. H.; Gomathinayagam, R.; Damodaran, C.; Salas, J. A.; Méndez, C.; Rohr, J. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 199-207.
38. Pérez, M.; Baig, I.; Braña, A. F.; Salas, J. A.; Rohr, J.; Méndez, C. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2295-2304.

謝辞

本研究に際し、始終御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科教授 大島 吉輝先生に謹んで御礼申し上げます。

副査として本論文の審査にあたり、有益なる御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科准教授 土井 隆行先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、様々なお力添えをいただきました東北大学大学院薬学研究科教授 倉田 祥一朗先生に心より御礼申し上げます。

細部に至る御指導と御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科准教授 菊地 晴久先生に謹んで御礼申し上げます。

生物活性試験をはじめ、公私共にお力添えをいただきました東北大学大学院薬学研究科助教 加藤 泰弘先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、様々な御助力をいただきました東北大学大学院薬学研究科助教 浅井 禎吾先生に謹んで御礼申し上げます。

数々の試料を御提供いただきました公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所 波田野 和樹様に厚く御礼申し上げます。

貴重な試料を御提供いただきました日本マイクロバイオファーマ株式会社 坂田 紀秋様に深く感謝いたします。

NMR スペクトル、質量スペクトル測定の労をとられました東北大学大学院薬学研究科中央分析室の諸氏に厚く御礼申し上げます。

本研究を続けるにあたり数々の御指導、御助言をいただきました東北大学大学院薬学研究科医薬資源化学分野 石河 真弥修士、有泉 加奈子修士、磯辺 真人修士、熊谷 史由修士、壁谷 尚宏修士、佐藤 雄一修士、中村 哲也修士、齊藤 純英学士、並びに教室員の方々に深く感謝致します。

最後に、これまで様々な面においてあたたく見守っていただいた私の家族に対し心から感謝いたします。